



Salomé Soares da Silva Moço

Licenciada em Engenharia de Materiais

**Impregnação de fibras de celulose com
nanopartículas de prata, óxido de zinco
e óxido de cobre para aplicações anti-
bacterianas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia de Materiais

Orientador: Elvira Fortunato, Professora Doutora, FCT-
UNL

Co-orientador: Rita Branquinho, Doutora, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor João Pedro Botelho Veiga

Arguente: Prof. Doutora Isabel Maria dos Santos Leitão Couto



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro 2013

Impregnação de fibras de celulose com nanopartículas de prata, óxido de zinco e óxido de cobre para aplicações antibacterianas

© Salomé Soares da Silva Moço

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Começo por mostrar toda a minha satisfação e felicidade na finalização de uma grande etapa da minha vida. Este curso ofereceu-me, para além de grandes aprendizagens, novos amigos e novas esperanças de um grande futuro.

Tudo isto foi possível graças à presença de muitas pessoas, a elas devo o meu profundo e sentido agradecimento.

Começo por agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Elvira Fortunato pela oportunidade de realizar este trabalho consigo, pela sua orientação, motivação e liberdade oferecidas; à minha co-orientadora Doutora Rita Branquinho que ao longo dos últimos meses se desdobrou para me ajudar, pela sua transmissão de conhecimentos, sugestões e dúvidas tiradas de modo a seguir o melhor trajecto neste trabalho. Agradeço também a disponibilidade e simpatia dada pela Professora Margarida Santos, do Departamento de Ciências da Vida, na realização dos testes anti-bacterianos; a todas as pessoas que trabalham no Centro de Investigação de Excelência CENIMAT pela ajuda na realização desta dissertação, em especial à Investigadora Daniela Gomes, por todas as análises obtidas por microscopia electrónica de varrimento e à Professora Patrícia Carvalho do Instituto Superior Técnico pelas imagens obtidas por microscopia electrónica de transmissão. Agradeço à empresa TNS pelas amostras de tecidos fornecidas para o meu estudo.

Em especial agradeço muito aos meus pais por todo o amor, carinho, paciência, ajuda e compreensão que sempre me deram ao longo de toda a minha vida. À minha irmã que acredita muito em mim e tem sempre algo positivo a dizer.

Ao Rui Jacinto um grande e profundo obrigada por todas os sentimentos bons que sempre me deu, pela sua a confiança, paciência, companheirismo, ternura e amor.

À minha grande amiga Sara Gil por toda a sua energia positiva, pelas suas gargalhadas, pela sua amizade, disponibilidade e grande ajuda desde o início ao fim do meu percurso académico.

Aos meus amigos Joana Duarte, João Fonseca, João Oliveira, Ruben Raposo e a todos os que não mencionei mas que de certa forma me apoiaram em todo o meu curso um grande e sentido obrigada!

Resumo

O aumento de doenças infecciosas causadas por diferentes micro-organismos patogénicos e o desenvolvimento de novas estirpes de bactérias resistentes aos actuais antibióticos representam uma séria ameaça à saúde pública. Um grande número dessas infecções ocorre através de contaminações alimentares e em ambientes hospitalares. A investigação de novos agentes anti-bacterianos com baixa toxicidade e capacidade de inibir a contaminação microbiana é de extrema importância no contexto da criação de novos materiais para cuidados de saúde, embalagens e outro tipo de aplicações.

O papel é um material imprescindível nos dias de hoje, muito utilizado e com excelentes propriedades e características, sendo um óptimo substrato em diversas áreas de investigação. Este trabalho aborda o papel como um possível substrato na utilização de variadas aplicações no contexto anti-bacteriano devido ao seu baixo custo, biodegradabilidade, flexibilidade, porosidade, entre outras propriedades.

Com a existência de novas áreas de investigação, como é o caso da nanotecnologia, é possível sintetizar nanopartículas que, através de técnicas de impregnação, são introduzidas no papel, dando novas propriedades às fibras de celulose criando assim, novos materiais com excelentes funcionalidades e muito úteis em diversas aplicações.

No presente trabalho foi estudada a impregnação de dois tipos distintos de papel (papel de Filtro de café e papel *Whatman*) com nanopartículas de prata - NPsAg, nanopartículas de óxido de zinco - NPsZnO e nanopartículas de óxido de cobre – NPsCuO. As propriedades anti-bacterianas dos papéis impregnados com NPs foram testadas contra três tipos diferentes de bactérias: *Escherichia coli* DH5 α , *Staphylococcus aureus* NCTC8325 e *Staphylococcus aureus* COL.

Concluiu-se que os melhores resultados obtidos contra a bactéria *Escherichia coli* DH5 α foi o papel filtro de café impregnado com nanopartículas de prata sintetizadas via citrato de sódio, com baixa concentração (0,1 mM) e contra as bactérias *Staphylococcus aureus* NCTC8325e *Staphylococcus aureus* COL o mesmo tipo de papel impregnado com nanopartículas de prata, com uma concentração mais elevada (1 mM).

Todos os substratos de papel que apresentaram actividade anti-bacteriana funcionaram a baixas temperaturas (25 °C), o que permite várias aplicações na área da medicina, por exemplo, no uso de papel de parede impregnado com nanopartículas para unidades hospitalares que requerem zonas esterilizadas, produtos específicos que promovam um tratamento adequado a dermatites, na área desportiva em têxteis impregnados com nanopartículas, na área alimentar em filtros de água e embalagens alimentares, entre outros.

Palavras-chave: Fibras de celulose; Nanopartículas de prata, óxido de zinco e óxido de cobre; Técnicas de impregnação; Actividade anti-bacteriana; *Escherichia coli* DH5 α ; *Staphylococcus aureus* NCTC8325; *Staphylococcus aureus* COL.

Abstract

The increase of infectious diseases caused by various pathogenic microorganisms and the development of new strains of bacteria resistant to current antibiotics, represent a serious threat to public health. A large number of these infections occur through food contamination and in hospital settings. The search for new antibacterial agents with low toxicity and ability to inhibit the microbial contamination is the most important factor in the context of the creation of new materials for healthcare, packaging and other applications.

Nowadays, paper is a very current material with excellent properties, characteristics and is considered an exceptional substrate in various research fields. This work discusses paper as a substrate to employ in different applications such as in a context antibacterial, due to its properties: low cost product, biodegradable, flexible, porous and among others.

With new research area of, mainly the nanotechnology studies, it is possible to synthesize nanoparticles that, by impregnation techniques, are introduced in the paper, giving new properties to cellulose fibers and thus creating new materials and applications.

In the present work the impregnation of two different types of paper (coffee filter paper and Whatman paper) with silver nanoparticles – AgNPs; zinc oxide nanoparticles – ZnONPs and copper oxide nanoparticles – CuONPs, was studied. The antibacterial properties of papers impregnated with NPs were tested against three different types of bacterias: *Escherichia coli* DH5 α , *Staphylococcus aureus* NCTC8325 and *Staphylococcus aureus* COL.

In conclusion, the better results against the bacterium *Escherichia coli* DH5 α was coffee filter paper impregnated with synthesized AgNPs by sodium citrate, with low concentration (0.1 mM), and against bacterium *Staphylococcus aureus* NCTC8325 and *Staphylococcus aureus* COL was the same functionalized paper, with a higher AgNPs concentration (1 mM).

All papers worked at low temperature (25 °C) and this fact promote applications in medicine, for example, in the use of wall paper impregnated with nanoparticles for hospitals that require sterilized areas, specific wipes and diapers in order to support adequate treatment the dermatitis; in sports, like textiles impregnates with nanoparticles; the food industry, in water filters and food packaging, and other applications.

Keywords: Cellulose fiber; Silver nanoparticles, Zinc oxide nanoparticles; Copper oxide nanoparticles; Impregnation techniques; Antibacterial activity; *Escherichia coli* DH5 α ; *Staphylococcus aureus* NCTC8325; *Staphylococcus aureus* COL.

Lista de Acrónimos

ADN – Ácido desoxirribonucleico
AKD – Dímero de alquil ceteno
ASA – Anidrido succínico alcenilo
CEMOP – *Center of Excellence in Microelectronics Optoelectronics and Processes*
CENIMAT – Centro de Investigação de Materiais
CMC – Carboximetilcelulose
CRT – Cathode ray tube
DLS – Dispersão dinâmica de luz
DRX – Difracção de raios-X
ERO – Espécies reactivas de oxigénio
Gram - - Gram negativa
Gram + - Gram positiva
MH – Muller-Hinton
MRSA – Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*
NIR – Infravermelho próximo
NOK – Não ocorreu actividade anti-bacteriana
NPs – Nanopartículas
NPsAg – Nanopartículas de prata
NPsCuO – Nanopartículas de óxido de cobre
NPsZnO – Nanopartículas de óxido de zinco
OK – Ocorreu actividade anti-bacteriana
PAE – Poliamida Epicloridrina
PAM – Poliacrilamida
PEI - Polietilenimina
PEO - Óxido polietileno
PG – Peptidoglicano
poliDADMAC – Poli cloreto de (dial dimetilamonio)
PVP – Polivinilpirrolidona
Redox – Redução – oxidação
SEM – Microscópio electrónico de varrimento
TEM – Microscópio electrónico de transmissão
UV – Ultra Violeta
Vis – Visível

Lista de símbolos

Ag – Prata
Ag⁺ - Iões de prata
AgNO₃ – Nitrato de prata
B₂H₆ – Diborano
C – Concentração
CaCO₃ – Carbonato de cálcio
C₆H₅Na₃O₇.H₂O – Citrato de sódio
(C₆H₁₀O₅)_n – Celulose
C₆H₅O₇H₃ – Ácido cítrico
cm – Centímetro
cm/mim – Centímetro por minuto
Cu – Cobre
Cu²⁺ - Iões de cobre
CuO – Óxido de cobre
d – Distância interplanar
g – Grama
g/m² – Grama por metro quadrado
g/ml – Grama por mililitro
g/mol – Grama por mole
G – Guaiacilo
G/S – Guaiacilo-seringilo
h – Horas
H – Hidrogénio
H₂O – Água
H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio
HO• - Radical hidroxilo
IC_R – Índice de cristalinidade
I_(am) – Intensidade de difracção
I₍₀₀₂₎ – Intensidade máxima observada
K – Factor de forma
kg/m³ – Quilograma por metro cúbico
KNO₃ – Nitrato de potássio
kV – Quilovolt
M – Molar
ml – Mililitro
mm – Milímetro
mM – Milimolar
NaBH₄ – Borohidreto de sódio
NaNO₃ – Nitrato de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
Na₂SO₄ – Sulfato de sódio
nm – Nanómetro
O – Oxigénio
rpm – Rotações por minuto
T – Temperatura
u.a. – Unidades arbitrárias
W – Watt
ZnO – Óxido de zinco
Zn(OH)₂ – Hidróxido de zinco
ZnSO₄.7H₂O – Sulfato de zinco heptahidratado
θ_{hkl} – Ângulo de difracção de Bragg
θ – Ângulo de incidência do feixe
2D – Bidimensional

λ - Comprimento de onda
° - Grau
° **C** – Grau Celsius

Objectivos

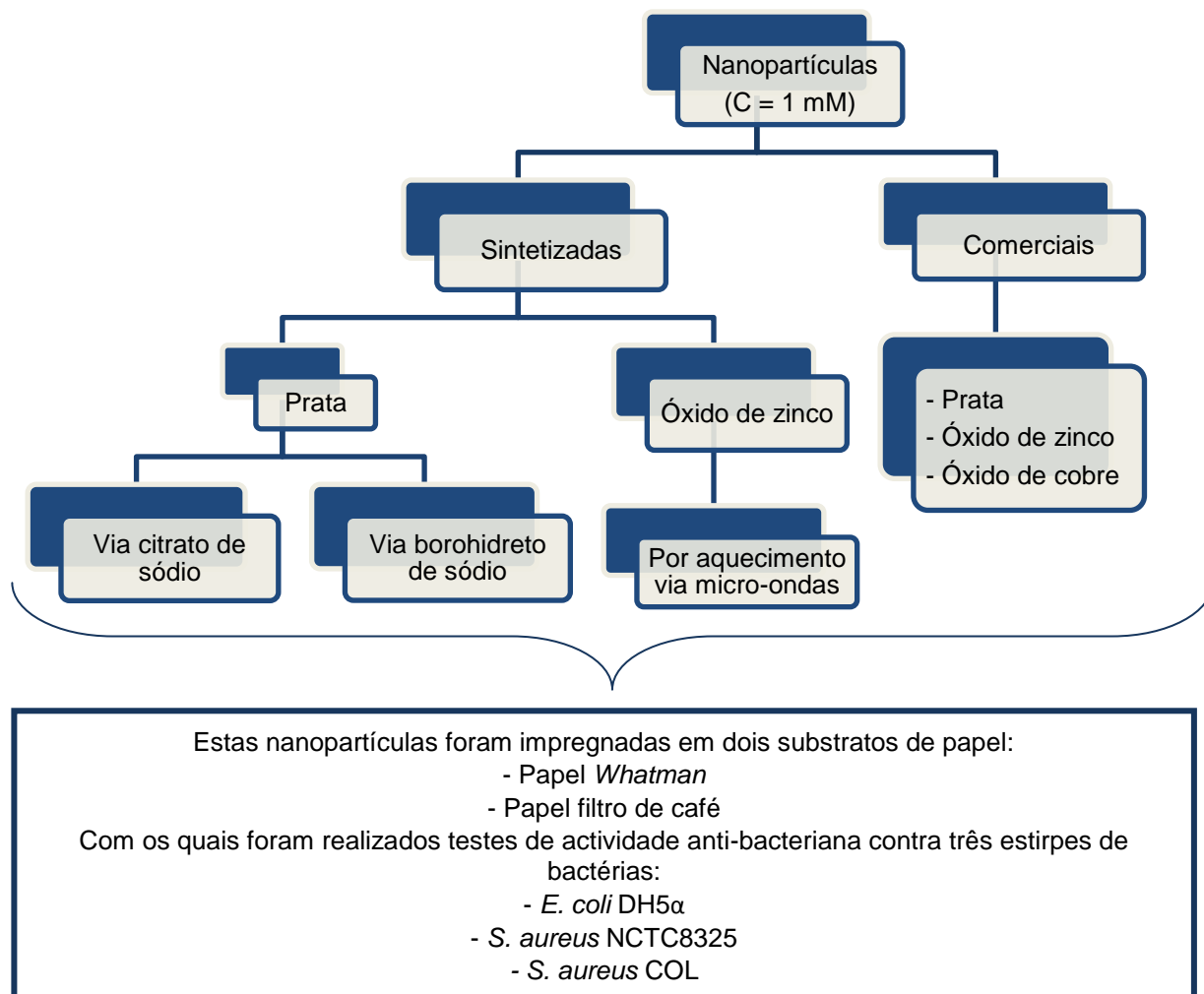
O papel é um material há muito utilizado em inúmeras áreas e, com o avanço da tecnologia e o desenvolvimento de novas áreas de investigação, criam-se novas expectativas que conduzem a diferentes aplicações para o papel. São diversas as suas propriedades, desde o seu baixo custo até ao processo de reciclagem, que o conduzem a recorrentes aplicações como substrato.

Neste trabalho, pretende-se mostrar a utilização do papel como substrato em aplicações anti-bacterianas, através da impregnação de fibras de celulose com diferentes tipos de nanopartículas.

Os objectivos deste estudo visam a caracterização de dois substratos de papel para aplicações anti-bacterianas, o estudo e a síntese das nanopartículas que, ao serem impregnadas nas fibras de celulose, apresentam eficácia contra três estirpes de bactérias, distinguir a melhor técnica de impregnação e secagem dos substratos de papel com as nanopartículas, a realização de testes anti-bacterianos ao papel impregnado e o estudo do efeito da concentração na impregnação dos substratos de papel e na actividade anti-bacteriana.

Este tema permite explorar muitas das aprendizagens existentes ao longo do curso de Engenharia de Materiais, que passam pela caracterização dos materiais, que proporciona um conhecimento à macro e à nanoescala dos mesmos, a possibilidade de lidar de diferente forma com várias técnicas, bem como todo o trabalho de laboratório e análise dos resultados obtidos. O trabalho oferece também, a oportunidade de novas aprendizagens com a ligação da área dos Materiais com outras áreas existentes, como é o caso das Ciências da Vida, onde foram abordadas novas áreas do conhecimento científico.

Em seguida apresenta-se um esquema representativo do trabalho desenvolvido.



Índice de Matérias

| | | |
|-------------|--|----|
| Capítulo 1: | Introdução..... | 1 |
| 1.1. | O Papel..... | 1 |
| 1.1.1. | História do papel..... | 1 |
| 1.1.2. | Matérias-primas..... | 2 |
| 1.1.3. | Composição química do papel | 2 |
| 1.1.4. | Fabrico do papel..... | 4 |
| 1.1.5. | Propriedades do papel | 5 |
| 1.2. | Nanopartículas | 5 |
| 1.2.1. | Propriedades das nanopartículas..... | 6 |
| 1.2.2. | Nanopartículas de prata | 7 |
| 1.2.3. | Nanopartículas de óxido de zinco | 8 |
| 1.2.4. | Nanopartículas de óxido de cobre..... | 9 |
| 1.3. | Actividade anti-bacteriana | 9 |
| 1.3.1 | Bactérias..... | 11 |
| 1.3.2 | Nanopartículas vs Bactérias – Mecanismos de actuação..... | 12 |
| 1.4. | Aplicações do papel funcionalizado com nanopartículas..... | 13 |
| Capítulo 2: | Técnicas de Caracterização | 15 |
| 2.1. | Técnicas de caracterização morfológica | 15 |
| 2.1.1. | Microscopia electrónica de varrimento..... | 15 |
| 2.1.2. | Microscopia electrónica de transmissão | 16 |
| 2.1.3. | Perfilometria 3D..... | 17 |
| 2.2. | Técnicas de caracterização óptica, composicional e estrutural..... | 17 |
| 2.2.1. | Espectrofotometria Ultravioleta-Visível | 17 |
| 2.2.2. | Dispersão de luz dinâmica | 18 |
| 2.2.3. | Difracção de raios-X | 18 |
| Capítulo 3: | Materiais e métodos experimentais..... | 21 |
| 3.1. | Materiais | 21 |
| 3.1.1. | Síntese das nanopartículas | 21 |
| 3.2. | Técnicas de impregnação e secagem do papel..... | 23 |
| 3.2.1. | Técnicas de impregnação | 23 |
| 3.2.2. | Secagem do papel..... | 25 |
| 3.3. | Testes anti-bacterianos | 26 |
| 3.3.1. | Procedimento de preparação e análise dos testes anti-bacterianos | 26 |
| 3.3.2. | Materiais de controlo utilizados nos testes anti-bacterianos..... | 27 |
| Capítulo 4: | Apresentação e discussão de resultados..... | 29 |
| 4.1. | Caracterização dos substratos de papel | 29 |
| 4.1.1. | Caracterização morfológica..... | 29 |
| 4.1.2. | Caracterização composicional e estrutural | 32 |
| 4.2. | Caracterização dos diferentes tipos de nanopartículas sintetizadas | 33 |
| 4.2.1. | Nanopartículas de prata | 34 |
| 4.2.1.1. | Caracterização morfológica..... | 34 |

| | | |
|----------------------------------|---|----|
| 4.2.1.2. | Caracterização óptica, composicional e estrutural..... | 34 |
| 4.2.2. | Nanopartículas de óxido de zinco | 37 |
| 4.2.2.1. | Caracterização morfológica..... | 38 |
| 4.2.2.2. | Caracterização óptica, composicional e estrutural..... | 38 |
| 4.3. | Seleção do modo de secagem e das técnicas de impregnação das nanopartículas às fibras de celulose | 40 |
| 4.3.1. | Secagem dos substratos de papel | 40 |
| 4.3.2. | Técnicas de impregnação | 41 |
| 4.4. | Caracterização das fibras de celulose impregnadas com os diferentes tipos de nanopartículas | 46 |
| 4.4.1. | Impregnação dos substratos de papel com nanopartículas de prata | 46 |
| 4.4.2. | Impregnação dos substratos de papel com nanopartículas de óxido de zinco .. | 48 |
| 4.4.3. | Impregnação dos substratos de papel com nanopartículas de óxido de cobre.. | 50 |
| 4.5. | Estudo da actividade anti-bacteriana dos materiais produzidos | 51 |
| 4.5.1. | Actividade anti-bacteriana dos materiais de controlo..... | 51 |
| 4.5.2. | Actividade anti-bacteriana das nanopartículas de prata | 53 |
| 4.5.3. | Actividade anti-bacteriana das nanopartículas de óxido de zinco | 59 |
| 4.5.4. | Actividade anti-bacteriana das nanopartículas de óxido de cobre..... | 61 |
| Capítulo 5: | Conclusões e Perspectivas Futuras | 63 |
| Referências bibliográficas | | 67 |

Índice de Figuras

| | | |
|---------------|--|----|
| Figura 1.1 - | Ts'ai Lun..... | 1 |
| Figura 1.2 - | Estrutura molecular da celulose | 3 |
| Figura 1.3 - | a) Estrutura da parede celular das fibras de celulose; b) Estrutura das fibras de celulose..... | 3 |
| Figura 1.4 - | Taça de Lycurgus | 6 |
| Figura 1.5 - | Método Top-down..... | 6 |
| Figura 1.6 - | Método Bottom-up | 6 |
| Figura 1.7 - | Classificação de produtos convencionais e não convencionais com agentes anti-bacterianos..... | 10 |
| Figura 1.8 - | Estrutura da parede celular de uma bactéria Gram positiva (Gram +) | 11 |
| Figura 1.9 - | Estrutura da parede celular de uma bactéria Gram negativa (Gram -)..... | 12 |
| Figura 1.10 - | Mecanismos de toxicidade das NPs contra as bactérias..... | 13 |
| Figura 2.1 - | Microscópio Electrónico de Varrimento, SEM..... | 16 |
| Figura 2.2 - | Gama de sinais emitidos durante a interação de um feixe altamente energético de electrões com um material | 16 |
| Figura 2.3 - | Microscópio Electrónico de Transmissão, TEM | 17 |
| Figura 2.4 - | Perfilometro | 17 |
| Figura 2.5 - | Espectrofotómetro UV-Visível | 18 |
| Figura 2.6 - | Dispersão de Luz dinâmica, DLS | 18 |
| Figura 2.7 - | Difracção de raio-X, DRX | 19 |
| Figura 3.1 - | Sonificador..... | 23 |
| Figura 3.2 - | Sistema de deposição <i>Dip-coater</i> | 24 |
| Figura 3.3 - | Sistema utilizado para a impregnação horizontal dos substratos de papel..... | 24 |
| Figura 3.4 - | Pistola de <i>spray</i> utilizada na pulverização com volume..... | 25 |
| Figura 3.5 - | Placa de aquecimento: Heidolph MR Hei-End..... | 25 |
| Figura 3.6 - | Estufa: EHRET-TK 4067 furnace | 25 |
| Figura 3.7 - | Exemplo de cultura de bactérias usada nos testes anti-bacterianos | 27 |
| Figura 3.8 - | Controlo positivo <i>Aquacel Ag</i> | 27 |
| Figura 3.9 - | Controlo positivo <i>Hansaplast</i> | 27 |
| Figura 3.10 - | Controlo negativo papel filtro de café..... | 27 |
| Figura 3.11 - | Controlo negativo papel <i>Whatman</i> | 27 |
| Figura 4.1 - | Imagens de SEM dos substratos de papel..... | 30 |
| Figura 4.2 - | Imagens topográficas 3D obtidas por perfilometria dos substratos de papel | 31 |
| Figura 4.3 - | Difractogramas obtidos para o papel <i>Whatman</i> e papel de filtro de café | 32 |
| Figura 4.4 - | Imagens obtidas por TEM das NPs _{Ag} | 34 |
| Figura 4.5 - | Espectro de absorvância das NPs _{Ag} sintetizadas via citrato de sódio e via borohidreto de sódio..... | 35 |
| Figura 4.6 - | Medidas de DLS do teste de envelhecimento para as NPs _{Ag} via citrato de sódio..... | 36 |
| Figura 4.7 - | Difractogramas obtido pela técnica de DRX para as NPs _{Ag} sintetizadas via citrato de sódio e via borohidreto de sódio | 37 |

| | | |
|---------------|--|----|
| Figura 4.8 - | Imagens de SEM das NPsZnO sintetizadas | 38 |
| Figura 4.9 - | Espectro de absorvância das NPsZnO sintetizadas | 39 |
| Figura 4.10 - | Difractograma obtido pela técnica de DRX para as NPsZnO sintetizadas | 40 |
| Figura 4.11 - | Secagem dos papéis na placa de aquecimento | 41 |
| Figura 4.12 - | Secagem dos papéis na estufa | 41 |
| Figura 4.13 - | Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com a suspensão de NPsAg via citrato de sódio | 43 |
| Figura 4.14 - | Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com a suspensão de NPsAg via borohidreto de sódio..... | 44 |
| Figura 4.15 - | Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com NPsAg | 47 |
| Figura 4.16 - | Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com NPsZnO..... | 49 |
| Figura 4.17 - | Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com NPsCuO | 50 |
| Figura 4.18 - | Imagens de SEM da bactéria <i>Escherichia coli</i> | 51 |
| Figura 4.19 - | Imagens de SEM da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> | 51 |
| Figura 4.20 - | Imagem de SEM do penso <i>Aquacel Ag</i> | 52 |
| Figura 4.21 - | Imagem de SEM do penso <i>Hansaplast</i> | 52 |
| Figura 4.22 - | Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel impregnados com NPsAg via citrato de sódio | 55 |
| Figura 4.23 - | Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com NPsAg via borohidreto de sódio | 56 |
| Figura 4.24 - | Comparação dos halos de inibição formados usando uma concentração de 1 mM e 10 mM nas NPsAg via citrato de sódio | 58 |
| Figura 4.25 - | Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com NPsZnO comerciais em pó..... | 60 |
| Figura 4.26 - | Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com NPsCuO comerciais..... | 62 |

Índice de Tabelas

| | | |
|--------------|---|----|
| Tabela 1.1 - | Aditivos adicionados na formação da folha de papel..... | 4 |
| Tabela 1.2 - | Propriedades do papel..... | 5 |
| Tabela 3.1 - | Nanopartículas utilizadas..... | 21 |
| Tabela 3.2 - | Reagentes utilizados nas sínteses de NPsAg..... | 21 |
| Tabela 3.3 - | Reagentes utilizados na síntese de NPsZnO..... | 22 |
| Tabela 3.4 - | Condições de crescimento das bactérias usadas nos testes anti-bacterianos.. | 26 |
| Tabela 4.1 - | Propriedades macroscópicas dos diferentes substratos estudados..... | 29 |
| Tabela 4.2 - | Valores de rugosidade de ambos os substratos de papel..... | 30 |
| Tabela 4.3 - | Picos de ângulos e planos cristalográficos representativos dos dois substratos de papel..... | 33 |
| Tabela 4.4 - | Índice de cristalinidade dos diferentes papéis..... | 33 |
| Tabela 4.5 - | Actividade anti-bacteriana dos materiais de controlo | 52 |
| Tabela 4.6 - | Actividade anti-bacteriana das NPsAg e dos materiais de controlo..... | 53 |
| Tabela 4.7 - | Actividade anti-bacteriana das NPsAg sintetizadas via citrato de sódio e via borohidreto de sódio variando a concentração | 57 |

Capítulo 1: Introdução

1.1.O Papel

O papel é um elemento onnipresente nas sociedades modernas, das múltiplas situações de comunicação aos espaços domésticos, da higiene à actividade produtiva. Configura-se mesmo como um factor decisivo de modernização, enquanto catalisador dos mecanismos de troca, ao propagar a divulgação de conhecimentos ou facilitar a mobilidade das mercadorias através da embalagem [1].

Neste trabalho, devido às suas propriedades e ao baixo custo, o papel teve como função servir de substrato para aplicações anti-bacterianas. Foram utilizados dois tipos de papel que foram caracterizados estrutural e morfológicamente de forma a determinar qual dos dois substratos de papel apresentava melhores resultados nas aplicações em causa.

1.1.1. História do papel

A produção do papel, inicia-se nas fibras vegetais, passando pela sua desintegração para depois as entrelaçar, comprimir e fazer aderir num novo formato. Este percurso começa longe no tempo e no espaço, pois a invenção do papel atribui-se tradicionalmente ao mítico chinês *Ts'ai Lun* (Figura 1.1), funcionário real que, no ano de 105 d.C., teria experimentado a desagregação de vegetais, fixando-se no bambu, para se reconstruir num produto inovador, sob a forma de folhas leves e lisas: o papel [1].



Figura 1.1 - Ts'ai Lun [1]

O papel ao ser um material leve e barato, rapidamente se espalhou pelo império chinês, substituindo os suportes anteriormente usados, caros e pouco práticos. Gera-se um verdadeiro universo do papel, na medida em que este não propicia apenas a escrita e a multiplicação do livro, mas permite muitas outras aplicações, usando-se no vestuário, na chapeleira, na decoração, no equipamento militar, mais tarde na esfera monetária.

Na insistente procura do papel, em que muitas fibras vegetais se experimentaram (palha, palmeira, juta, alfa ou esparto), chegou a vez das árvores: se todas as plantas têm celulose, indispensável ao papel, era preciso encontrar as mais adequadas de entre as disponíveis, o que desde logo variou consoante as regiões, e depois desenvolver a técnica para isolar a celulose, que deveria produzir-se em quantidade, a preços aceitáveis e de forma continuada, para alimentar a máquina também ela “contínua” de papel.

Assim, depois de um período de incubação para investigação e aplicação prática, os tipos das pastas de madeira para papel dividem-se em [1]:

1. Pastas mecânicas;
2. Pastas semi-químicas;
3. Pastas químicas;
 - 3.1 Por processo de soda;
 - 3.2 Por processo bissulfito;
 - 3.3 Por processo sulfato;

A partir do século XX, foram feitas melhorias técnicas substanciais para a optimização do produto, para o apuramento dos processos químicos, para o controlo das operações no sentido de minimização dos efeitos ambientais, bem como a criação de novas tipologias tanto no papel como no cartão, com ganhos de produtividade aos vários níveis da cadeia de produção. As

inovações não ocorrem só ao nível dos papéis, com o aparecimento de grandes variedades, mas também nas embalagens [1].

1.1.2. Matérias-primas

O papel é, por definição, um material fino e flexível, constituído por uma rede de fibras de celulose naturais que são depositadas a partir de uma suspensão aquosa. O material que se obtém é uma rede de fibras interligadas que formam uma estrutura tridimensional com espessura média entre 30 e 300 μm . O diâmetro de uma fibra de celulose está compreendido entre 10 e 50 μm , pelo que uma folha de papel com espessura de 100 μm tem entre 2 e 10 fibras de espessura [2].

A coesão necessária à formação da folha é garantida fisicamente pelo entrelaçamento das fibras e quimicamente por pontes de hidrogénio. Na obtenção destas fibras de celulose, usa-se preferencialmente como matéria-prima a madeira proveniente do tronco de árvores, sendo por isso a celulose de origem vegetal [2, 3, 4].

A madeira que serve de matéria-prima às fibras de celulose é dividida em dois grupos, o grupo das resinosas “*softwood*” por exemplo o Pinheiro, e o grupo das folhosas “*hardwood*” por exemplo o Eucalipto. As fibras resinosas são longas ($\pm 3 \text{ mm}$) e de maior qualidade, logo mais caras, formando um papel mais coeso e resistente. As fibras folhosas são mais curtas ($\pm 1 \text{ mm}$), baratas e conferem boas características de impressão [5, 6].

Para além da madeira existem variadas plantas das quais são extraídas fibras de celulose. As principais fontes de celulose alternativas à madeira são bagaço da cana-de-açúcar, bambu, juta, cânhamo, linho, algodão e também algumas gramíneas como trigo, cevada ou arroz. Apesar de representarem uma pequena percentagem do volume de fibras virgens inseridas na indústria do papel, apresentam algumas vantagens. Podem frequentemente ser produzidas em áreas onde não é possível plantar árvores. Produzem geralmente uma colheita anual com maior rendimento que a madeira e atingem a maturidade em menor tempo que a maioria das árvores, que podem demorar cerca de dez ou vinte anos a atingir a maturidade necessária. Existem também bactérias que produzem celulose, muito embora este tipo de celulose não seja utilizado no fabrico do papel [2].

1.1.3. Composição química do papel

O papel é maioritariamente composto por celulose, hemicelulose e lenhina.

A composição química do papel depende da fonte de celulose e do tratamento químico ao qual a madeira foi submetida para produzir a pasta de papel. Quando a pasta de papel não é tratada quimicamente a sua composição é muito semelhante à composição da fonte de celulose [2]. Em geral, os tratamentos químicos reduzem a percentagem de lenhina, hemicelulose e de outros componentes e aumentam a percentagem de celulose.

A madeira tem na sua constituição diversas células que desempenham determinadas funções na vida da árvore, dependendo da espécie, a madeira possui uma parede celular constituída por cerca de 40 – 50 % de fibrilas de celulose, embebidas numa matriz de hemicelulose (20 – 35 %) e lenhina (20 – 30 %). Os restantes componentes, presentes em menor quantidade, são compostos de baixo peso molecular, geralmente designados por extractáveis (1 – 5 %) e cinzas (< 1 %) [7].

• Celulose

A celulose foi descoberta em 1838 pelo químico francês Anselme Payen, que isolando-a da restante matéria constituinte da planta determinou a sua fórmula química. Em 1920 seria Hermann Staudinger a determinar a estrutura polimérica da celulose.

Desempenhando um importante papel na estrutura das plantas, a celulose (Figura 1.2) é um dos polímeros orgânicos mais comuns e é considerada uma fonte quase inesgotável de matéria-prima. A celulose pertence ao grupo dos polissacarídeos estruturais, sendo a sua fórmula química $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$, trata-se do primeiro componente estrutural da parede celular e depois de removida a lenhina e outros componentes existentes torna-se o principal componente estrutural do papel.

A celulose possui diversas propriedades úteis para inúmeras aplicações e indústrias, possuindo excelentes propriedades mecânicas, morfológicas, geométricas e superficiais, estando disponível em grande quantidade sendo reciclável e tendo um baixo custo de produção [6].

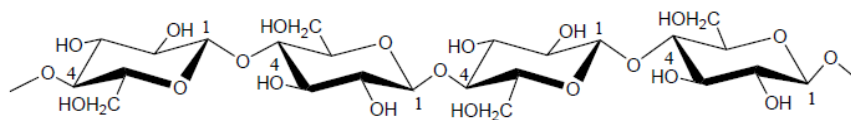


Figura 1.2 - Estrutura molecular da celulose

Na figura 1.3 a) e b) estão representadas a estrutura da parede celular e estrutura das fibras de celulose respectivamente.

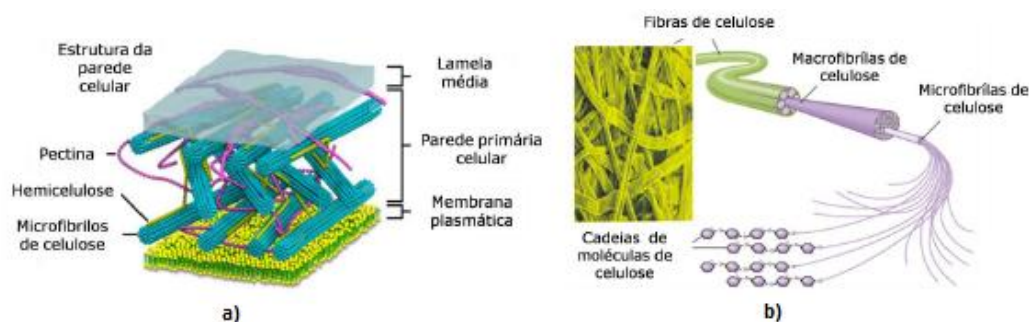


Figura 1.3 - a) Estrutura da parede celular das fibras de celulose; b) Estrutura das fibras de celulose [8, 9]

A celulose existente na pasta de papel tem normalmente cadeias compostas por 300 a 1700 unidades, o grau de cristalinidade depende da fonte de celulose no caso do algodão e algumas algas, como a *Valonia*, dão origem a uma celulose com um elevado grau de cristalinidade, ao passo que a celulose da madeira tende a ser menos cristalina [2].

O monómero de glucose é produzido durante a fotossíntese da planta. Na formação da folha de papel, para além dos agentes ligantes, são as ligações de hidrogénio que proporcionam uma forte interacção entre as múltiplas fibras que constituem o papel, concedendo a resistência necessária para a sua formação.

Existem dois tipos de celulose de origem vegetal, a celulose do tipo I e do tipo II. A celulose do tipo I é constituída por cadeias de glucose dispostas paralelamente, a estrutura é metaestável e termodinamicamente instável. A celulose do tipo II é mais estável termodinamicamente apresentando uma estrutura em que as cadeias de glucose estão dispostas anti-paralelamente. Entre os dois tipos de celulose, a celulose tipo I é a mais frequente, dividindo-se em I_α e I_β , consoante a sua cristalinidade. Existem também, mais três tipos de celulose (III, IV, V) sendo estas obtidas por via química [6].

• Hemicelulose

A hemicelulose ou polioses são heteropolímeros com uma estrutura amorfa localizadas na parede celular tal como a celulose mas, com uma cadeia bem mais curta e ramificada que esta. Este constituinte químico da madeira apresenta-se numa percentagem de 20 – 35 % em peso seco da madeira, dependendo este valor do tipo de espécie de madeira (*hardwood* ou *softwood*), sendo que normalmente a madeira de folhosas apresenta maior teor de hemicelulose que as espécies resinosas.

No caso das madeiras folhosas as hemiceluloses maioritárias são as glucuronoxilanas ou xilanas (20 – 35 %) e apresentam um grau de polimerização entre 100 e 200 variando consoante a espécie. A principal hemicelulose presente nas madeiras resinosas é a O-acetilgalactoglucomanana que consiste na união da galactose, glucose e manose, que constitui cerca de 20 % do peso seco da madeira. Um segundo importante grupo de hemicelulose

encontrado nas madeiras resinosas é o arabino-4-O-metilglucuronoxilana e corresponde a cerca de 5 a 10% da massa da madeira [7].

Determinadas propriedades do papel poderão ser otimizadas através da hemicelulose. Pensa-se que no processo de refinamento, a hemicelulose, fica adsorvida às fibras de celulose contribuindo para o melhoramento das ligações entre as fibras, estando também relacionada com o aumento de volume da pasta de papel devido à sua natureza hidrofílica que favorece a conformação das fibras molhadas durante a formação da folha de papel [6].

• Lenhina

A lenhina é, a seguir à celulose, o constituinte mais abundante na madeira. É uma macromolécula com a forma de uma rede polimérica tridimensional e não cristalina. Tem como função unir as células reforçando e agregando o material fibroso da madeira, sendo assim responsável pela rigidez, resistência mecânica e proteção contra microrganismos patogénicos. A lenhina presente nas madeiras folhosas denomina-se lenhina guaiacilo-seringilo ou G/S. Em madeiras resinosas a lenhina predominante é do tipo guaiacilo (G) [2, 7].

• Aditivos e outros componentes

Como já foi referido o papel é um substrato heterogéneo que envolve muitas escalas de comprimentos de periodicidades físicas e químicas. O papel pode ser considerado um tecido de fibras curtas descontínuas com aditivos. Do ponto de vista químico o papel é constituído por fibras lignocelulósicas e por aditivos funcionais que melhoram as suas propriedades.

A tabela 1.1 refere os aditivos geralmente utilizados na formação da folha de papel.

Tabela 1.1 - Aditivos adicionados na formação da folha de papel [10]

| Função | Aditivos mais comuns |
|--------------------------------|---|
| Enchimentos inorgânicos | Carbonato de cálcio, dióxido de titânio, caolin |
| Corantes | Branqueadores UV, cores e elementos anti-amarelecimento |
| Agentes de colagem | Dímero de alquil ceteno (AKD), Anidrido succínico alcelino (ASA) |
| Auxiliares de retenção | Polielectrolitos: Poliacrilamida (PAM), Polietilenimina (PEI) |
| Polímeros neutros | Óxido de polietileno (PEO) |
| Amido | |
| Micropartículas | Betonite, sílica |
| Revestimentos | Látex, amido, carboneto de cálcio, estireno anidrido maleico |
| Agentes de resistência | Poliamida epicloridrina (PAE) Carboximetilcelulose (CMC), Policloreto de (dial dimetilamónio) (poliDADMAC). |

Estes aditivos são normalmente adicionados por processos que maximizem a sua dispersão, formando domínios químicos distintos sobre as fibras, com uma cobertura de superfície numa gama de 5 – 50 % [10].

1.1.4. Fabrico do papel

O primeiro passo no processo de fabrico de papel é a separação dos constituintes da madeira, nomeadamente da lenhina cujas propriedades são todas prejudiciais às características finais de uma folha de papel.

Uma vez que oxida fotoquimicamente, a lenhina é responsável pelo amarelecimento e fragilidade do papel, pelo que a sua remoção da pasta de papel é fundamental para a obtenção de um produto estável e duradouro. O papel de jornal é um bom exemplo dos efeitos da presença de lenhina na pasta de papel [2, 6, 11].

Na separação dos constituintes da madeira pretende-se obter a maior percentagem de celulose com a menor degradação possível. Devido à lenhina residual, o produto resultante apresenta uma cor acastanhada, pelo que é comum ser submetido a processos de branqueamento.

Seguidamente as fibras passam por um processo de pré tratamento que se divide em duas fases, dispersão e refinação. A dispersão assegura a separação e uniformização das fibras da pasta na suspensão aquosa. A refinação, processo que obriga as fibras em suspensão a passar entre duas placas metálicas, uma móvel e uma estacionária, altera as características das fibras através de processos mecânicos e hidráulicos, influenciando as propriedades da folha de papel. Uma folha feita a partir de fibras não refinadas é pouco coesa, muito volumosa, possui

elevada capacidade de absorção, elevada porosidade e opacidade, e uma estrutura irregular [11].

Com o acréscimo dos aditivos forma-se a pasta de papel, dando-se de seguida início à formação da folha de papel que começa pela remoção de água, num tapete equipado com drenagem simples e vácuo. De seguida, a pasta é prensada, seca e por fim bobinada em grandes rolos. Neste circuito os processos de secagem são variados, incluindo também a passagem por soluções que aplicam tratamentos superficiais ao papel [11].

1.1.5. Propriedades do papel

Existem muitas propriedades que definem e diferenciam os diversos tipos de papel, bastando uma pequena variação dos parâmetros do processo para que essas propriedades sejam alteradas. Para além das alterações aos parâmetros também as mudanças de matéria-prima e a eliminação de uma etapa do processo, como o branqueamento, impõem alterações significativas nas características do papel final.

Entre outras propriedades do papel, as propriedades mais relevantes são apresentadas na tabela 1.2 [12, 13].

Tabela 1.2 - Propriedades do papel

| Propriedade | Definição |
|---------------------------------|---|
| Gramagem | Peso por unidade de área (g/m^2) |
| Volume | Relaciona o volume com o peso do papel |
| Espessura | Indicador da compactabilidade da folha |
| Estabilidade dimensional | Indicador da distribuição uniforme das fibras numa folha de papel |
| Diafaneidade | Propriedade de alguns materiais em deixar passar a luz |
| Textura | Diferencia o papel quando à sua textura: macio ou áspera |
| Absorção e humidade | Como as fibras de papel são hidrofílicas o papel terá propriedades higroscópicas |
| Bilateralidade | Diferença entre a face que está em contacto com a máquina e a face superior |
| Isotropia | Resultante do alinhamento das fibras devido à tracção exercida pela máquina durante a formação da folha |
| Propriedades ópticas | Brancura, brilho, opacidade e cor |
| Porosidade | Cerca de 70 % |
| Resistência | Capacidade de suportar solicitações externas |

1.2. Nanopartículas

A Nanociência e a Nanotecnologia têm-se tornado um importante e crescente campo para na investigação e inovações tecnológicas. Contudo, não são ciências novas. A história também contém muitos exemplos de estruturas nanométricas, como as nanopartículas (NPs), onde os primeiros relatos de sistemas similares a estes datam épocas bem anteriores à ciência moderna, onde nanopartículas metálicas eram usadas em diversas aplicações como por exemplo: para produzir efeitos coloridos em vidros e cerâmicas, como é o caso da conhecida Taça de *Lycurgus* (Figura 1.4) que quando é iluminada pelo lado de fora apresenta a cor verde mas, quando iluminada por dentro a taça torna-se vermelha. Esta diferença de cores deve-se à presença de nanopartículas de ouro dispersas no interior da matriz vítrea. Entre outras aplicações as nanopartículas foram também utilizadas como agente anti-microbiano na desinfecção de líquidos armazenados, contra a febre tifoide e o bacilo antrax e no tratamento de feridas e queimaduras [14].



Figura 1.4 - Taça de Lycurgus

Nos últimos anos vários estudos foram impulsionados pela habilidade de controlar as propriedades dos materiais através do tamanho das partículas, tornando significativamente diferentes quando comparado às suas propriedades à macroescala. Com todo este historial, muitos materiais metálicos à nanoescala são hoje em dia alvo de um intenso estudo e muito utilizados em várias aplicações pois conferem propriedades específicas.

São vários os métodos de síntese conhecidos para a obtenção de materiais à nanoescala que podem ser divididos em métodos físicos (*Top-down*, Figura 1.5), onde um material em escala maior pode ser manipulado até à escala desejada, e em métodos químicos (*Bottom-up*, Figura 1.6), onde o material é sintetizado com um controlo átomo a átomo (ou molécula a molécula).



Figura 1.5 - Método Top-down

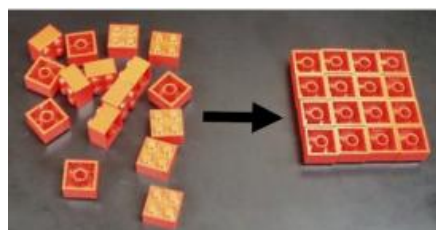


Figura 1.6 - Método Bottom-up

Uma das razões que levou ao estudo, neste trabalho, do uso das nanopartículas como agente anti-bacteriano é a sua elevada área superficial que leva ao aparecimento de novas propriedades mecânicas, químicas, eléctricas, ópticas e magnéticas, electro-ópticas e magneto-ópticas [15]. Este estudo baseou-se em três diferentes tipos de nanopartículas, sendo estas: nanopartículas de prata (NPsAg), nanopartículas de óxido de zinco (NPsZnO) e nanopartículas de óxido de cobre (NPsCuO). Foram seleccionadas estas NPs devido aos recentes estudos sobre este tipo de materiais em aplicações anti-bacterianas, devido ao seu simples modo de obtenção, às suas amplas utilizações e potenciais aplicações, para além de serem materiais baratos.

De seguida, abordar-se-á cada um deste tipo de nanopartículas em particular referindo as suas principais propriedades, aplicações e métodos de síntese.

1.2.1. Propriedades das nanopartículas

As nanopartículas são partículas com tamanho entre 1 – 100 nm, podem ser de materiais metálicos ou não metálicos, podendo-se apresentar na forma de aerossol, em suspensões ou em emulsões e os seus principais parâmetros são a forma, tamanho e a sua sub-morfologia estrutural [16].

Existem várias formas das diferentes propriedades dos materiais serem alteradas pelo tamanho das partículas. Normalmente, as mudanças mais significativas nas propriedades dos materiais, ocorrem quando as partículas apresentam um tamanho entre 1 – 10 nm. Tais mudanças são conhecidas como confinamento quântico (efeitos quânticos de tamanho) e a sua origem está directamente relacionada ao tipo de ligação química do cristal. Este tipo de efeito quântico dá-nos a possibilidade de desenhar as propriedades dos materiais.

São várias as propriedades que são dependentes do tamanho, sendo estas: propriedades térmicas, quânticas, estruturais, mecânicas, ópticas, eléctricas e magnéticas.

As propriedades intrínsecas de uma nanopartícula não são só determinadas pelo seu tamanho mas também pela sua forma, composição, cristalinidade e estrutura, que dependem muito do método e das condições experimentais usadas na sua síntese [17].

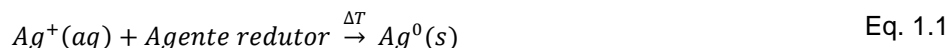
1.2.2. Nanopartículas de prata

• Propriedades e aplicações

No caso das NPsAg estas apresentam como principais propriedades a elevada condutividade, estabilidade química e actividade anti-bacteriana. Com estas propriedades, este tipo de nanopartículas apresenta-se como um interessante candidato na investigação de materiais em sensores colorimétricos, catalisadores, produtos anti-falsificações e produtos anti-bacterianos. Contribuem, significativamente, para o reforço da actual prevenção de infecções e terapias anti-virais devido à sua eficácia em pequenas quantidades, mínima toxicidade e efeitos secundários. Como foi já mencionado, o tamanho da partícula e a sua distribuição de tamanhos são características muito importantes no estudo das nanopartículas. Estes parâmetros determinam a mortalidade biológica e a toxicidade, visando a capacidade dos sistemas das nanopartículas. Apesar destas excelentes propriedades das nanopartículas de prata como possível agente anti-bacteriano, as nanopartículas apresentam algumas limitações. Por exemplo, o seu pequeno tamanho e a sua elevada área superficial podem levar à agregação das partículas, tornando a manipulação física das nanopartículas difícil em formas líquidas e secas. Esta agregação pode levar à perda de propriedades relacionadas com a natureza das partículas à escala nanométrica [10, 18].

• Síntese das nanopartículas de prata

Neste trabalho foram sintetizadas nanopartículas de prata através dos métodos químicos (*bottom-up*). Este tipo de métodos de síntese permitem variar a escolha do precursor de prata, do agente redutor, a quantidade relativa e a concentração, a temperatura, a taxa de mistura, duração da reacção e muitos outros parâmetros. Pelo uso de diferentes reagentes e condições de síntese, pode-se esperar variações na forma da partícula, no tamanho e na distribuição de tamanhos. Os métodos químicos são baseados em reacções em solução que levam à formação de coloides de nanopartículas dispersas num solvente adequado. Em geral, estes métodos químicos ocorrem através da redução dos iões de prata (Ag^+) usando diferentes agentes redutores como o citrato de sódio, borohidreto de sódio, ascorbato, álcool e polióis por irradiação por raios gama, raios ultra-violeta, micro-ondas e ultra-sons (equação Eq.1.1). Os agentes redutores não só protegem as nanopartículas de prata de precipitarem como também têm influência no seu tamanho, distribuição de tamanhos, na morfologia e biocompatibilidade. Consoante o tipo e proporção do agente redutor é diferente a sua influência em cada síntese [19, 20, 21, 22].



No presente estudo os agentes redutores utilizados foram o citrato de sódio e o borohidreto de sódio. O citrato de sódio é um composto de fraca redução quando comparado com o borohidreto de sódio, normalmente são necessárias elevadas temperaturas para realizar esta síntese.

A síntese via redução por citrato de sódio consiste numa via sintética, com aquecimento directo onde é usado o citrato de sódio que pode actuar como agente redutor ou como estabilizador, pois consegue-se controlar o processo de crescimento pela escolha do estabilizador, conseguindo-se manipular a forma e tamanho das nanopartículas metálicas. Na síntese via borohidreto de sódio é necessária a adição de um grande excesso de borohidreto de sódio para reduzir os iões de prata e estabilizar as nanopartículas formadas. Na síntese de nanopartículas de prata, quer usando o citrato de sódio quer usando o borohidreto de sódio, são sínteses que possibilitam a produção de partículas em regimes de diferentes tamanhos, são sínteses simples com passos claros e que requerem equipamentos de laboratório

acessíveis a todos. O tamanho e a forma das nanopartículas de prata obtidas dependem, em ambos os casos, das condições usadas [23].

Um dos grandes desafios relacionados a estes procedimentos químicos consiste, exactamente, em se manter as nanopartículas estáveis numa faixa de tamanho, evitando a sua aglomeração. Apesar de não ter sido utilizado neste trabalho, um dos modos de controlar a aglomeração das nanopartículas é a utilização de moléculas orgânicas de cadeias longas, designadas estabilizadores, na superfície das nanopartículas, sendo estas essenciais para a sua estabilização e posterior manipulação. As nanopartículas em solução tendem a aglomerar-se facilmente devido às interações de *London*, é a repulsão que existe pelas moléculas de estabilizante na superfície das nanopartículas que evitam a sua coalescência [19, 21]. Os estabilizadores também participam no processo de crescimento das nanopartículas. Ao variarmos a relação molar entre o precursor metálico e o ligante podemos, em alguns sistemas, sintetizar nanopartículas com tamanhos diferentes. Quanto menor for a concentração do estabilizador, maior será o diâmetro médio das nanopartículas formadas.

De entre os estabilizadores existentes, o polivinilpirrolidona (PVP) é o que apresenta características mais interessantes, pois apresenta a capacidade de doar os seus electrões livres dos átomos de oxigénio e nitrogénio à orbital sp dos iões de prata, formando-se assim um complexo de iões de prata-PVP na solução aquosa, promovendo-se a nucleação da prata metálica porque o complexo formado é mais facilmente reduzido pelo agente redutor, que os iões de prata puros, permitindo aos iões de prata receberem mais nuvens electrónicas do PVP que da água. O PVP acelera o processo de redução química durante a formação de nanopartículas de prata e fornece uma maior estabilização esférica e uma reduzida taxa de crescimento [19, 20, 21, 22].

1.2.3. Nanopartículas de óxido de zinco

- **Propriedades e aplicações**

As nanopartículas de óxido de zinco apresentam variadíssimas propriedades, tais como a estabilidade a elevadas temperaturas e em pH neutro, boas propriedades ópticas, eléctricas e químicas, elevada transmitância e são um semicondutor com elevado hiato energético. Com estas propriedades são inúmeras as possíveis aplicações para as nanopartículas de óxido de zinco, que abrangem variadíssimas áreas da engenharia como por exemplo na electrónica em foto-detectores, materiais ópticos, células solares, sistemas eléctricos e optoelectrónicos, na área da saúde com o uso de nanopartículas de óxido de zinco em absorsores UV para cosméticos e agentes anti-vírus de revestimentos, em produtos anti-bacterianos e no tratamento de águas residuais. Podem ser usadas nanopartículas de óxido de zinco em materiais cerâmicos, biosensores e sensores de gás, catalisadores, enchimentos para borrachas e plásticos, catalisadores, pigmentos e tintas UV [24, 25].

- **Síntese de nanopartículas de óxido de zinco**

A síntese de nanopartículas com diferentes morfologias e tamanhos, usando diferentes métodos têm sido bastante desenvolvidas. As propriedades das NPs, como foi já mencionado, dependem do tamanho, forma e do seu método de síntese. Consoante a síntese utilizada nas nanopartículas é possível alterar a sua morfologia e propriedades. Controlando alguns parâmetros durante a síntese (por exemplo: pH, temperatura, concentração, etc.) evita-se a aglomeração das nanopartículas, o que é desejado, pois quanto maior a área superficial das NPs, ou seja quanto menor o tamanho da partícula, maior é o efeito anti-bacteriano conseguido pelas nanopartículas.

Nos últimos anos, vários investigadores em todo o mundo, têm usado diferentes técnicas para sintetizar nanopartículas de óxido de zinco tais como, a deposição química de vapores, electrodeposição, sínteses hidrotérmicas, método sol-gel, técnicas de micro-emulsão, evaporação térmica, ablação laser, moagem mecânica e método micro-ondas obtendo NPsZnO com diferentes morfologias [24, 25, 26].

Neste estudo para a síntese das nanopartículas de óxido de zinco foi usado o método por aquecimento via micro-ondas. O uso da radiação micro-ondas tem-se mostrado um método novo, eficiente e amigo do ambiente para a síntese de vários tipos de nanopartículas de óxidos de metais com diversas morfologias e tamanhos. A radiação micro-ondas apresenta propriedades únicas, tais como o aquecimento volumétrico homogéneo que provoca o aquecimento directamente dentro da amostra, a elevada taxa de reacção, a selectividade e o

elevado rendimento da reacção, para além de ser um processo energeticamente favorável. Em comparação com o aquecimento convencional, o aquecimento via micro-ondas proporciona uma distribuição uniforme da temperatura em todo o material, conduzindo assim à rápida formação de nanopartículas de óxido de zinco [26].

1.2.4. Nanopartículas de óxido de cobre

- **Propriedades e aplicações**

Tal como as nanopartículas de prata e de óxido de zinco as nanopartículas de óxido de cobre também apresentam actividade anti-bacteriana, para além da supercondutividade a elevadas temperaturas, boas propriedades fotocatalíticas e fotovoltaicas e boa eficiência térmica. São estas, algumas das propriedades, que tornam o estudo das nanopartículas de óxido de cobre interessante, pois permitem o seu uso na produção de produtos anti-bacterianos como por exemplo em têxteis, embalagens alimentares, em sensores de gás, catalisadores, baterias, na conversão de energia solar, emissores de campo, circuitos electrónicos, entre outros [27, 28, 29].

- **Síntese de nanopartículas de óxido de cobre**

Apesar de neste estudo não ter sido realizada a síntese de nanopartículas de óxido de cobre, existem vários métodos para a sua produção, tais como plasma térmico, métodos sonoquímicos, método sol-gel, método de reacção no estado sólido à temperatura ambiente, métodos electroquímicos, decomposição térmica de precursores, a co-implantação de iões metálicos e oxigénio e métodos de precipitação aquosa. Tal como as sínteses anteriormente referidas para os outros tipos de nanopartículas, nestes métodos variando os parâmetros de síntese também se obtém nanopartículas com diferentes formas e tamanhos [27, 28, 29].

Pelo acima mencionado verifica-se que todas as nanopartículas em estudo apresentam variadíssimas propriedades e são usadas numa vasta gama de potenciais aplicações anti-bacterianas devido a apresentarem um largo espectro deste tipo de actividade e elevada toxicidade a diferentes tipos de micro-organismos. Assim, existem vários mecanismos de actuação das nanopartículas contra as bactérias. Passa-se a explicar o que se entende por actividade anti-bacteriana, qual o tipo de bactérias em estudo e quais os mecanismos de actuação das nanopartículas de prata, nanopartículas de óxido de zinco e nanopartículas de óxido de cobre contra as bactérias.

1.3. Actividade anti-bacteriana

Os anti-bacterianos podem ser definidos como um grupo de substâncias de várias fontes, como por exemplo de origem bacteriana, fúngica, semi-sintética ou sintética, que têm em comum a propriedade de provocar a morte ou a inibição do crescimento bacteriano.

A actividade anti-bacteriana está relacionada com compostos que matam localmente as bactérias ou abrandam o seu crescimento sem ser no geral tóxico para o tecido circundante. Geralmente, os agentes podem ser classificados ou como bactericidas, que matam as bactérias, ou bacteriostáticos, que inibem o crescimento bacteriano.

Os agentes anti-bacterianos são normalmente usados no tratamento e/ou prevenção de infecções causadas por bactérias patogénicas em humanos e animais. De acordo com a literatura, os produtos anti-bacterianos podem ser divididos em duas categorias. A primeira categoria está relacionada com os produtos convencionais onde se incluem o sabão, os detergentes e produtos de tecidos que contêm, principalmente, agentes anti-bacterianos orgânicos (Figura 1.7); a segunda categoria de produtos anti-bacterianos é constituída pelos produtos não-convencionais que incorporam agentes anti-bacterianos inorgânicos onde se incluem os substratos de papel impregnados com nanopartículas estudados neste trabalho [30].

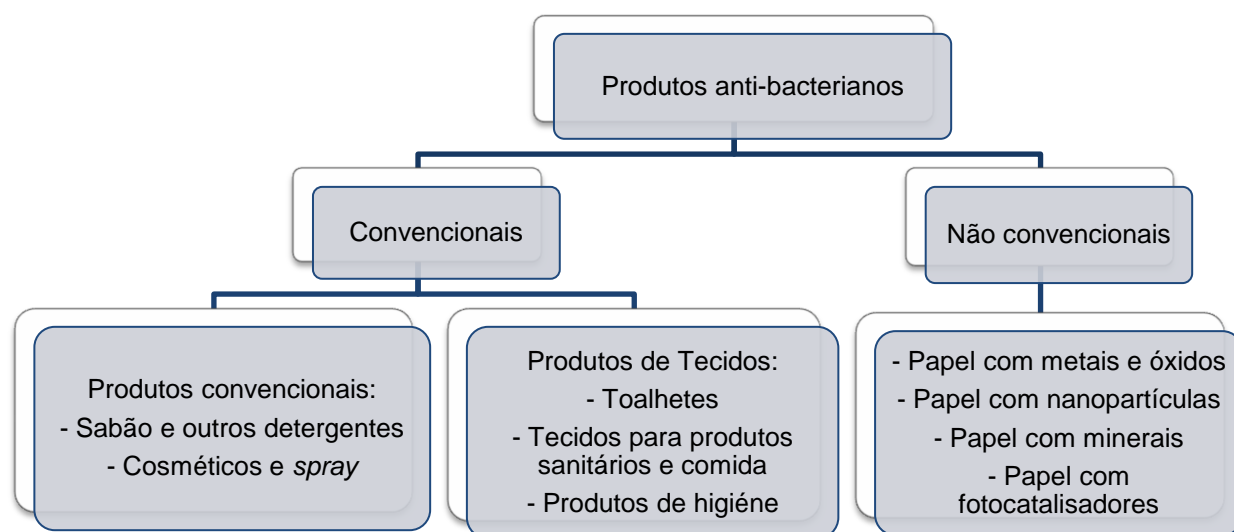


Figura 1.7 - Classificação de produtos convencionais e não convencionais com agentes anti-bacterianos [30]

Os agentes anti-bacterianos orgânicos são os anti-bacterianos mais utilizados, contudo apresentam algumas desvantagens, tais como o baixo ponto de fusão e ebulição, a sua tendência para volatilizar ou decompor-se e a toxicidade.

Os materiais anti-bacterianos inorgânicos são normalmente usados na forma de um composto, o que em comparação com os materiais orgânicos é considerado de elevada segurança, por não ser volátil e por ser resistente ao calor [30].

Os anti-bacterianos actuam contra os micro-organismos interferindo na síntese da parede celular, inibindo a formação de peptidoglicano (PG) e activando enzimas que destroem essa parede, aumentando a permeabilidade da membrana celular, interferindo com a síntese de proteínas ou alterando o metabolismo dos ácidos nucleicos [31, 32]. Os agentes anti-bacterianos são, então, fundamentais no combate a doenças infecciosas e na resistência do organismo contra os micro-organismos. No entanto, com o seu amplo uso e abuso, o aparecimento de resistência bacteriana aos fármacos anti-bacterianos tornou-se um fenómeno comum.

A resistência é na maioria das vezes baseada num processo evolutivo que pode ocorrer, por exemplo, durante a administração de um antibiótico. Este tipo de resistência bacteriana pode ser natural, em que as bactérias são naturalmente resistentes ao agente anti-microbiano, ou adquirido, caso em que as bactérias inicialmente sensíveis se tornam mais tarde resistentes a esse anti-bacteriano [33].

Um agente anti-bacteriano ideal deverá, entre outras, apresentar as seguintes características:

- Eficácia contra o agente causador da infecção;
- Sem efeitos laterais ou toxicidade;
- Administração cómoda;
- Baixo preço.

As razões que tornam as nanopartículas interessantes nesta área é, como já mencionado, a sua elevada área superficial que permite um maior contacto com a bactéria levando a danos irreversíveis ou até mesmo à morte celular. Os iões metálicos, como a prata, o zinco e o cobre, apresentam capacidades anti-bacterianas e anti-fúngicas, quando impregnados em minerais, misturados num veículo formando um composto ou quando aplicados em revestimentos a sua libertação adequada pode, efectivamente, inibir o nascimento e/ou crescimento de micróbios. Desta forma o papel impregnado com nanopartículas pode-se tornar um relevante anti-bacteriano no tratamento de infecções com maior eficácia e na prevenção do crescimento de bactérias em meios prejudiciais ao ser humano.

No presente trabalho, foram usadas bactérias Gram positivas (Gram +) e Gram negativas (Gram -), sendo que as bactérias Gram positivas usadas foram: *Staphylococcus aureus* NCTC8325 (*S. aureus* NCTC8325) e *Staphylococcus aureus* COL (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) – estirpe clínica). No caso das bactérias Gram negativas foi

usada uma única estirpe; *Escherichia coli* DH5 α (*E. coli*). Foram selecionadas estas bactérias devido ao facto de toda a pesquisa teórica feita sobre o tema, mencionar estes tipos de estirpes como as mais relevantes e problemáticas neste tipo de aplicações anti-bacterianas, tendo-se também tido em conta a sua disponibilidade [15, 41, 42].

1.3.1 Bactérias

As bactérias apresentam uma extraordinária diversidade e adaptabilidade sendo uma das formas de vida mais difundida no nosso planeta. As bactérias são micro-organismos procariotas e, por isso, não têm núcleo e possuem um único cromossoma em forma de anel [34]. Existem bactérias que provocam doenças em humanos, animais e plantas, bem como bactérias que são benéficas para estes.

Estes micro-organismos podem apresentar diferentes morfologias variando, de um modo geral, entre os 0,5 e os 10 μm . A parede celular bacteriana é desenhada para promover força, rigidez, forma e proteger a célula da ruptura osmótica e danos mecânicos. De acordo com a sua estrutura, componentes e funções da parede celular as bactérias podem ser divididas em duas principais categorias: Gram positiva e Gram negativa.

A parede celular das células Gram positiva (Figura 1.8) contém uma espessa camada (20 – 50 nm) de peptidoglicano que está ligado aos ácidos teicóicos que são únicos para a parede celular deste tipo de bactérias, como exemplos destas bactérias temos a bactéria *Staphylococcus aureus* que provoca doenças como gastroenterites, foliculite, endocardite, osteomielite, pneumonia e intoxicações alimentares e a bactéria *Bacillus cereus* (*B. cereus*) que também está relacionada a intoxicações alimentares [15, 35, 36]

Em contraste, a parede celular das bactérias Gram negativas (Figura 1.9) é mais complexa, tanto estruturalmente como quimicamente. Mais especificamente, nas bactérias Gram negativa, a parede celular compreende uma fina camada de peptidoglicano e contém uma membrana exterior, que abrange a superfície da membrana. A membrana exterior das bactérias Gram negativa confere resistência aos compostos hidrofóbicos e contém um único componente, lipopolisacárideos, que aumentam a carga negativa da membrana celular e são essenciais para a integridade estrutural e viabilidade da bactéria, como exemplos de bactérias Gram negativa temos a *Escherichia coli* (*E. coli*) que provoca diarreias, meningite neonatal, infecções nosocomiais, entre outras doenças, e a bactéria *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) que também provoca infecções nosocomiais e pneumonia [15, 37, 38, 39].

A estrutura da parede celular apresenta um importante papel na tolerância ou suscetibilidade da bactéria na presença de nanopartículas [15].

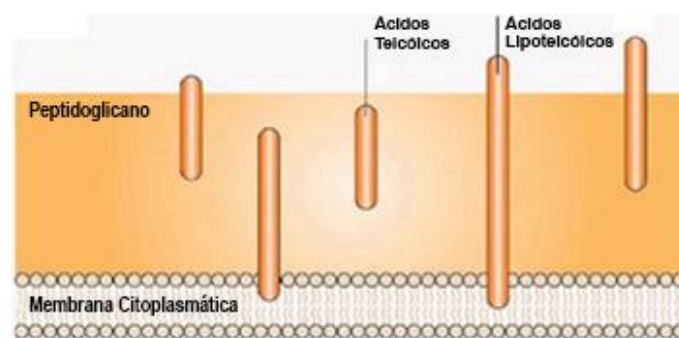


Figura 1.8 - Estrutura da parede celular de uma bactéria Gram positiva (Gram +) [15]

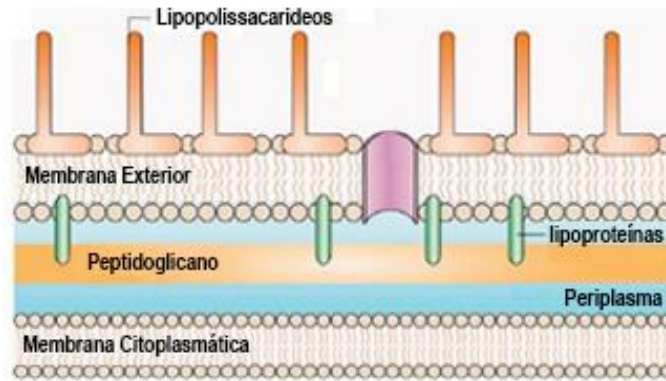


Figura 1.9 - Estrutura da parede celular de uma bactéria Gram negativa (Gram -) [15]

1.3.2 Nanopartículas vs Bactérias – Mecanismos de actuação

Os mecanismos exactos de toxicidade das nanopartículas contra as bactérias não são completamente entendidos, contudo existem já várias hipóteses de mecanismos de actuação das nanopartículas no interior e no exterior das bactérias. É sabido que esses mecanismos das NPs dependem de vários factores, tais como a composição, modificação superficial, propriedades intrínsecas das espécies bacterianas, concentração das nanopartículas e das bactérias, tamanho e forma das nanopartículas, temperatura, entre muitos outros factores [15]. Os mecanismos mais usuais que conduzem à morte celular através do uso de nanopartículas como agente anti-bacteriano são os que de seguida se apresentam [5, 15, 40, 41, 42, 43, 44, 45]:

- Ligação das nanopartículas à superfície da membrana celular o que leva a alterações nas funções vitais das bactérias, tais como a permeabilidade e respiração;
- Formação excessiva de espécies reactivas de oxigénio (ERO) que provocam danos na membrana celular e no ADN levando à morte celular.
- Penetração das nanopartículas no interior das bactérias levando à interacção das nanopartículas com os componentes das bactérias. Estes componentes são constituídos por enxofre e fósforo. Este tipo de mecanismo provoca *stress* oxidativo que se trata de uma perturbação do equilíbrio de oxidação-redução (redox) da bactéria que leva à produção de radicais livres em excesso que danificam os componentes celulares (proteínas, lípidos e ADN);
- Libertação de iões por parte das NPs que inibem múltiplas actividades das bactérias.

A Figura 1.10 ilustra os mecanismos de toxicidade das nanopartículas contra as bactérias acima referidos.

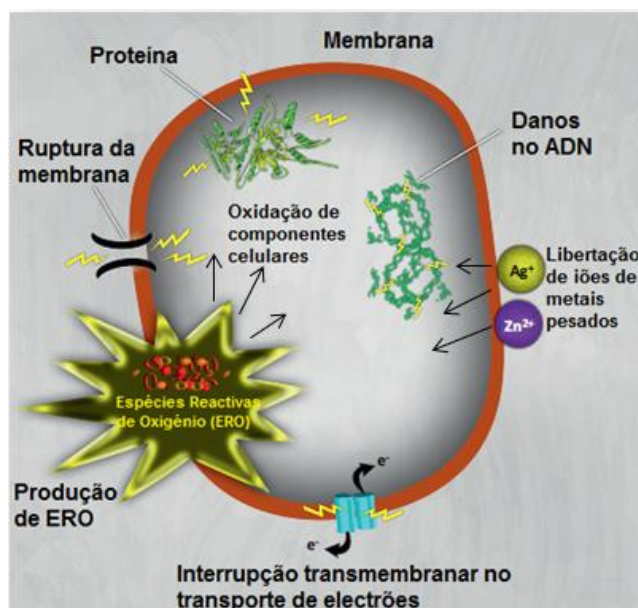


Figura 1.10 - Mecanismos de toxicidade das NPs contra as bactérias [15]

1.4.Aplicações do papel funcionalizado com nanopartículas

Quando se fala em papel pensa-se inicialmente num meio de escrita e impressão. Contudo, existem muitas outras aplicações para este material. Cerca de 40% do papel produzido mundialmente é utilizado em fins comunicativos e mais de 50% é usado em embalagens e papéis utilitários (lenços, papel absorvente, etc.). A restante percentagem de papel é utilizado em aplicações especializadas como saquetas de chá, meio de filtração e isolamento eléctrico [11].

No presente estudo aborda-se as vantagens do papel como substrato para a impregnação de nanopartículas para promoção de efeitos anti-bacterianos. A vantagem na sua utilização advém do facto de o papel ser um material de baixo custo, com uma elevada disponibilidade e abundância, biodegradável, por ter compatibilidade química com vários materiais, por possuir elevados teores de porosidade e também pelo facto de ser necessária uma pequena fracção volumétrica de nanopartículas para alterar significativamente as suas propriedades, tornando assim, o papel num excelente substrato em alternativa aos materiais anti-bacterianos usuais.

As emergentes aplicações do papel funcionalizado com nanopartículas podem ser divididas em três categorias:

- Diagnóstico de baixo custo para o ambiente e saúde;
- Produtos não tecidos fotocatalíticos, desinfetantes e anti-bacterianos;
- Papel para documentos e anti-falsificações.

Com o aumento da consciência das doenças e da transmissão de infecções de micro-organismos, o número de produtos revestidos com nanopartículas como agente anti-microbiano, como exemplo: gases, pensos curativos, roupas protectoras para trabalhos médicos e químicos, materiais de embalagem anti-bacterianos e tecidos de papel, tem aumentado [5, 14, 23, 46].

Também com o aumento das falsificações em todo o mundo, em quase todo o tipo de documentos incluindo notas, passaportes, certificados e bilhetes de transportes públicos, uma segurança mais avançada nos métodos de impressão (incluindo tintas e papéis de segurança) estão permanentemente a ser estudados de modo a proteger este tipo de documentos. A fluorescência desempenha uma função chave neste tipo de tecnologia anti-falsificação, pela identificação do objecto a partir de uma fonte de sinal óptico através da irradiação. Contudo, a fluorescência apresenta um rendimento quântico e uma foto-estabilidade fraca, levando a limitações foto-físicas. Com o uso de nanopartículas consegue-se aumentar a intensidade de emissão fluorescência até três mil vezes quando em contacto com fluoróforos aumentando assim os limites de detecção [10, 25].

Assim, o papel funcionalizado com nanopartículas pode-se tornar uma tecnologia disruptiva para o diagnóstico e catálise, superando desafios críticos, mantendo embora, o baixo custo e a flexibilidade do produto e do processo associado à fabricação do papel, tais como o tratamento de superfície e a impressão.

Capítulo 2: Técnicas de Caracterização

As técnicas analíticas usadas para a caracterização do papel funcionalizado com nanopartículas necessitam de ser focadas em três escalas de comprimento: nano, micro e macro. Estas escalas de comprimento permitem quantificar os estados de dispersão e agregação das nanopartículas (nanoescala); analisar os estados de absorção e cobertura das NPs na superfície dos micro-poros de papel (microescala) bem como explorar as propriedades ópticas do papel funcionalizado com nanopartículas (macroescala). Traduzindo-se numa nova metodologia para melhorar as propriedades do papel funcionalizado com nanopartículas.

De seguida, descrevem-se as técnicas de caracterização utilizadas neste estudo, de forma a caracterizar quer a nível estrutural quer morfológico os substratos de papel, as nanopartículas e o papel impregnado com as nanopartículas.

2.1. Técnicas de caracterização morfológica

A microscopia electrónica permite, através da interação entre um feixe de electrões altamente energético e a amostra, recolher informação morfológica sobre os materiais em estudo.

Existem três tipos principais de microscopia electrónica: varrimento, transmissão e emissão. A microscopia electrónica de varrimento (SEM do inglês *Scanning Electron Microscopy*) e de transmissão (TEM do inglês *Transmission Electron Microscopy*) utilizam um feixe de electrões incidente na amostra para produzir uma imagem ampliada. Em microscopia electrónica de emissão a fonte de electrões é a própria amostra.

2.1.1. Microscopia electrónica de varrimento

O microscópio electrónico de varrimento inclui na sua constituição uma fonte de electrões de alta energia (termoiónicamente emitida por um cátodo de tungsténio ou lantânio, ou geralmente via emissão de campo) que são acelerados para o ânodo; por um sistema condensador composto por lentes electromagnéticas que focam o feixe de electrões na amostra e pela lente objectiva que determina a resolução atingida pelo microscópio. Esta lente é colocada por cima da amostra, e não tem qualquer interferência na recolha do sinal da imagem

O funcionamento do SEM baseia-se no varrimento pelo feixe de electrões na superfície da amostra em observação.

Esta técnica apresenta como vantagens a obtenção de imagens altamente ampliadas (desde 10 - 1000000 vezes) da superfície do material devido ao feixe de electrões cujo comprimento de onda ($\lambda = 0,012 \text{ nm}$) é muito inferior ao dos fotões de luz visível ($400 \text{ nm} < \lambda_{\text{visível}} < 700 \text{ nm}$). Outra vantagem do SEM é a profundidade de campo [11, 47, 48].

Neste trabalho, o SEM, foi a principal técnica de caracterização utilizada. Esta técnica permite obter imagens da superfície dos dois tipos de substrato de papel, bem como das NPs e do papel impregnado com as nanopartículas. Através dessas identifica-se a morfologia fibrosa dos papéis e a morfologia das nanopartículas, permitindo também a observação do modo de dispersão e aglomeração das nanopartículas quando impregnadas no papel, dando a possibilidade de saber o tamanho aproximado das NPs.

Nestas caracterizações utilizou-se o equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB disponível no CENIMAT (Figura 2.1). Na obtenção das imagens foi utilizada uma tensão de aceleração de 2,00 kV, uma abertura de diafragma de 30,00 μm e uma distância de trabalho entre a amostra e a coluna de SEM de aproximadamente 5,3 mm. As amostras em estudo, por não serem condutoras, foram sujeitas a um processo de metalização, de modo a se obter uma fina camada de metal, neste caso ouro, à superfície por forma a melhorar a condutividade térmica e eléctrica das mesmas. A camada de ouro depositada apresenta uma espessura necessária à boa produção de iões secundários que são usados na formação da imagem [49].

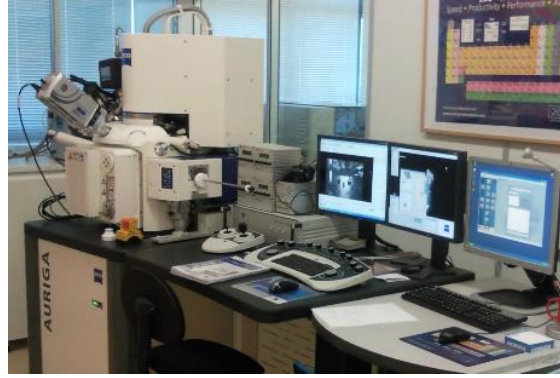


Figura 2.1 - Microscópio Electrónico de Varrimento, SEM [50]

2.1.2. Microscopia electrónica de transmissão

O princípio básico da microscopia electrónica de transmissão baseia-se na transformação da intensidade electrónica em intensidade luminosa num alvo, sendo posteriormente registada ou gravada fotograficamente. Com esta técnica é possível atingir resoluções da ordem dos angstroms tornando possível visualizar a forma como os átomos estão dispostos.

Nesta técnica, um feixe de electrões de elevada energia (entre os 100 kV e os 400 kV) incide na amostra. Os electrões primários do feixe ao incidirem na amostra dão origem a variadas interações fornecendo assim, uma vasta gama de sinais secundários provenientes da amostra, como ilustra a figura 2.2.

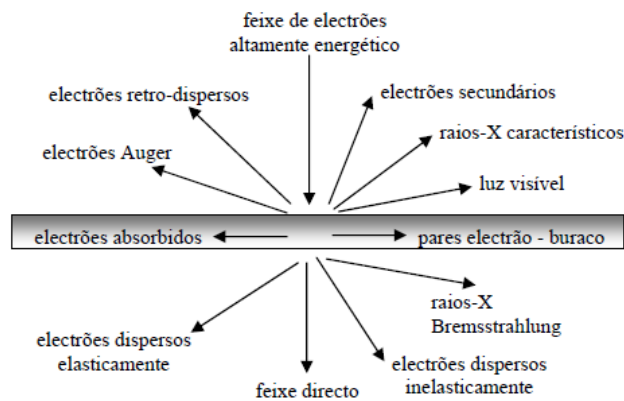


Figura 2.2 - Gama de sinais emitidos durante a interação de um feixe altamente energético de electrões com um material [51]

O TEM está equipado com detectores capazes de identificar electrões secundários, retrodifundidos, raios-X característicos mas, especialmente, tem detectores para identificar os electrões transmitidos. Estes electrões incidem num detector com uma chapa de fósforo que, tal como em fotografia, consiste num negativo da imagem real.

A preparação das amostras é fundamental uma vez que estas têm de ser finas o suficiente para se deixar atravessar pelos electrões. As zonas mais espessas da amostra vão impedir a chegada de electrões transmitidos à chapa, contribuindo para zonas mais escuras na imagem. [51, 52].

Na caracterização morfológica das nanopartículas de prata, recorreu-se ao microscópio electrónico de transmissão Hitachi H-8100II de 200 kV possuidor de um canhão de electrões por emissão térmica através de um filamento de LaB6 do Instituto Superior Técnico (Figura 2.3).



Figura 2.3 - Microscópio Electrónico de Transmissão, TEM [53]

2.1.3. Perfilometria 3D

A perfilometria é uma técnica que permite analisar a textura superficial dos materiais proporcionando uma imagem topográfica em duas e três dimensões (2D e 3D) dos mesmos. A técnica baseia-se no varrimento superficial da amostra em estudo, efectuado por uma ponta de prova de elevada precisão capaz de registar elevações e depressões à escala nanométrica. Desta forma obtemos o valor de rugosidade e espessura dos materiais [6, 56].

Esta técnica permitiu a medição dos valores de rugosidade e na obtenção de imagens topográficas 3D dos substratos de papel, para isso recorreu-se ao equipamento disponível no CENIMAT Ambios XP – Plus 200 Stylus (Figura 2.4).



Figura 2.4 - Perfilímetro [57]

2.2. Técnicas de caracterização óptica, composicional e estrutural

2.2.1. Espectrofotometria Ultravioleta-Visível

A espectrofotometria nas regiões das radiações ultravioleta e visível (UV-Vis) trata-se da medida de absorção ou transmissão de luz, é uma técnica não destrutiva muito importante na caracterização de materiais, permitindo determinar propriedades ópticas do material (absorvância, transmitância ou reflectância) em função do comprimento de onda da luz incidente.

Quando um feixe de luz monocromática atravessa uma solução, parte da luz é absorvida pela solução e a restante é transmitida. A absorção de luz depende, basicamente, da concentração das moléculas absorventes e da quantidade da solução. [6, 58].

Com esta técnica caracterizaram-se as suspensões de nanopartículas utilizadas, de modo a inferir sobre a distribuição de tamanhos das nanopartículas. Nas medidas efectuadas obtiveram-se espectros de absorvância com comprimentos de onda no intervalo de 300 – 700 nm, o espectrofotómetro utilizado foi UV-Vis-NIR Spectrophotometer – Shimadzu UV 3101 pc (Figura 2.5) que se encontra no CEMOP.



Figura 2.5 - Espectrofotômetro UV-Visível [59]

2.2.2. Dispersão de luz dinâmica

A técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) é uma técnica amplamente usada para determinar o tamanho das partículas na região submicrométrica.

A técnica de DLS mede o movimento Browniano das partículas e relaciona-o com o seu tamanho, ou seja quanto maior for a partícula mais lento será o seu movimento Browniano e quanto menor o tamanho da partícula mais rápido será o seu movimento.

A velocidade do movimento Browniano é definida pelo coeficiente de difusão translacional. De notar, que o diâmetro que é medido em DLS é um valor que se refere ao modo como uma partícula se difunde num fluido, ou seja é referido como um diâmetro hidrodinâmico, onde o diâmetro que é obtido é o diâmetro de uma esfera que possui o mesmo coeficiente de difusão translacional que uma partícula. O coeficiente de difusão translacional não depende apenas do tamanho da partícula, depende também da concentração e do tipo de íões que se encontram no meio. Factores esses, que afectam a velocidade de difusão das partículas.

O DLS baseia-se na análise da variação de intensidade, durante um período de tempo, da luz medida num ângulo fixo. Quando o tamanho da partícula possui a mesma ordem de magnitude de comprimento de onda da luz incidente, a intensidade da luz dispersa muda em função do ângulo. Desta forma, consegue-se determinar o diâmetro da partícula [60, 61].

Neste estudo, a técnica de DLS permitiu a caracterização morfológica das nanopartículas, possibilitando a determinação do tamanho de todas as nanopartículas em estudo. O equipamento usado foi Avid Nano – W130i SABRe optics (Figura 2.6) que se encontra no CENIMAT.



Figura 2.6 - Dispersão de Luz dinâmica, DLS

2.2.3. Difracção de raios-X

A técnica de difracção de raios-X, DRX (XRD, do inglês *X-Ray Diffraction*) é utilizada na caracterização estrutural dos materiais, identificando se o material é amorfo ou cristalino. Actualmente, esta técnica é usada para a determinação da estrutura cristalina, assim como das

fases cristalinas presentes no material, no tamanho da cristalite, em análises químicas e na determinação da orientação dos cristais.

A análise por difracção de raios-X baseia-se no facto de os planos cristalográficos de um composto irradiado por um feixe monocromático de raios-X com comprimento de onda reflectirem a radiação quando se cumpre a lei de Bragg (Eq. 2.1) que relaciona o comprimento de onda da radiação, a distância interplanar e o ângulo de incidência [6, 62].

$$2 d \sin \theta = n \lambda \quad \text{Eq. 2.1}$$

Onde:

n – Número inteiro

λ – Comprimento de onda dos raios-X

d – Distância interplanar (especifica de cada material)

θ – Ângulo de incidência do feixe

O DRX permite fazer um ensaio não destrutivo das nanopartículas analisadas, possibilitando o conhecimento da estrutura cristalina dos materiais, da sua orientação cristalográfica preferencial bem como o tamanho médio das cristalites, sendo assim importante para a confirmação da existência de nanopartículas e também para o estudo da dependência da estrutura cristalográfica com a síntese utilizada.

Através da técnica de DRX identificou-se a estrutura cristalina, os planos cristalográficos bem como a determinação do tamanho de cristalite das nanopartículas e dos substratos de papel utilizados. Para tal foi utilizado o equipamento X'Pert Pro da PANalytical, disponível no CENIMAT, com uma ampola de cobre na configuração de Bragg-Brentano (Figura 2.7).



Figura 2.7 - Difracção de raio-X, DRX

Capítulo 3: Materiais e métodos experimentais

3.1. Materiais

Para a realização deste estudo foram utilizados dois substratos de papel diferentes, com o intuito de comparar os modos de impregnação e eficácia do método usado. Os substratos de papel utilizados foram: (i) papel de cromatografia *Whatman* nº1 (*Filter Papers*; Cat No. 1001 150) e (ii) papel de filtro para café (*Home7*; Pingo Doce Distribuição Alimentar, S.A.).

No processo de impregnação foram depositadas nanopartículas de (i) prata (Ag); (ii) óxido de zinco (ZnO) e (iii) óxido de cobre (CuO). Para cada uma das nanopartículas estudadas foram realizados ensaios com nanopartículas sintetizadas e nanopartículas comerciais, de modo a permitir uma comparação em termos de tamanhos, morfologia e efeito anti-bacteriano das nanopartículas em estudo. A Tabela 3.1 mostra as diferentes nanopartículas utilizadas.

Tabela 3.1 - Nanopartículas utilizadas

| NPs | Tipo | Marca | Fórmula química | Massa Molecular (g/mol) | Concentração (mM) |
|----------------|---------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-------------------|
| Prata | Comerciais | PlasmaChem GmbH | Ag | 107,86 | 1 |
| | Sintetizadas | --- | Ag | | |
| Óxido de zinco | Comerciais em pó | PlasmaChem | ZnO | 81,38 | 1 |
| | Suspensão comercial | Evonik | ZnO | | |
| | Sintetizadas | --- | ZnO | | |
| Óxido de cobre | Comerciais | Aldrich | CuO | 79,55 | 1 |

3.1.1. Síntese das nanopartículas

• Síntese de nanopartículas de prata

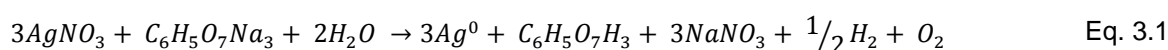
No presente estudo foram sintetizadas dois tipos de nanopartículas de prata de acordo com a literatura, ambas são baseadas em sínteses químicas onde é usado um agente redutor que tem a capacidade de reduzir a prata ($\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$). A diferença entre as sínteses encontra-se no agente redutor utilizado, uma vez que numa das sínteses foi utilizado o citrato de sódio [63] e na outra borohidreto de sódio [63, 64]. Na tabela 3.2 identificam-se os reagentes utilizados.

Tabela 3.2 - Reagentes utilizados nas sínteses de NPsAg

| Reagentes | Marca | Fórmula química | Massa molecular (g/mol) | Densidade (g/ml) | Pureza (%) |
|----------------------|----------------|--|-------------------------|------------------|------------|
| Nitrato de prata | Roth - BetaLab | AgNO_3 | 169,88 | 4,35 | ≥ 99 |
| Citrato de sódio | Roth - BetaLab | $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 294,1 | 1,76 | ≥ 99 |
| Borohidreto de sódio | Merck | NaBH_4 | 37,83 | 1,07 | --- |

➤ Síntese de nanopartículas de prata via citrato de sódio [63]

Nesta síntese a formação das nanopartículas de prata ocorre segundo a equação Eq. 3.1:

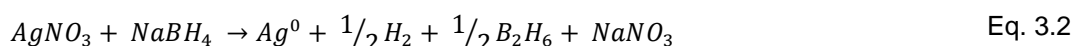


A síntese de nanopartículas de prata requer a preparação de duas soluções, (i) solução de nitrato de prata com uma concentração de 1 mM onde foram adicionados 100 ml de água destilada a 0,017 g de AgNO_3 e (ii) solução de citrato de sódio cuja concentração foi de 0.03 M onde se dissolveram 0,50 g de citrato de sódio em 50 ml de água.

Foram colocados 84 ml da solução de nitrato de prata em aquecimento com refluxo e sob agitação constante a uma velocidade de 1100 rpm. Deixou-se a solução entrar em ebulição e de seguida adicionou-se, gota a gota, 5 ml da solução de citrato de sódio. Manteve-se a agitação por cerca de dois minutos até se observar a mudança de cor da solução para uma tonalidade amarelada. Deixou-se reagir por dois minutos e retirou-se a solução do aquecimento, mantendo-se a agitação a frio. Por fim, deixou-se a solução em repouso arrefecendo à temperatura ambiente [63].

➤ Síntese de nanopartículas de prata via borohidreto de sódio [64]

Nesta síntese a formação de nanopartículas de prata ocorre segundo a equação Eq. 3.2



Tal como na síntese anterior, prepararam-se duas soluções: (i) solução de nitrato de prata com uma concentração de 1 mM onde foram adicionados 50 ml de água destilada a 8,5 mg de AgNO_3 e (ii) uma solução de borohidreto de sódio com uma concentração de 2 mM onde se adicionou 90 ml de água destilada a 68,1 mg de NaBH_4 .

Colocou-se a solução de NaBH_4 num banho de gelo durante cerca de vinte minutos, com uma agitação de 1100 rpm. Adicionaram-se, gota a gota, 3 ml da solução de AgNO_3 à solução de NaBH_4 arrefecida, notando-se uma tonalidade amarelada na solução que é indicativo da reacção de formação de NPsAg [64].

• Síntese de nanopartículas de óxido de zinco

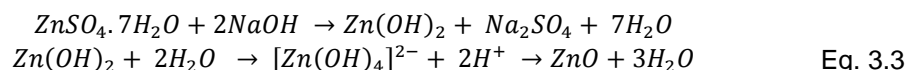
A síntese de nanopartículas de óxido de zinco foi realizada por aquecimento via micro-ondas. Este tipo de síntese provoca o aquecimento directamente dentro da amostra, oferecendo um elevado rendimento e uma elevada taxa de reacção, para além de ser um processo energeticamente favorável.

A tabela 3.3 identifica os reagentes utilizados na síntese das NPsZnO.

Tabela 3.3 - Reagentes utilizados na síntese de NPsZnO

| Reagentes | Marca | Fórmula química | Massa molecular (g/mol) | Densidade (g/ml) | Pureza (%) |
|---------------------------------|---------------|---|-------------------------|------------------|------------|
| Sulfato de zinco heptahidratado | Sigma-Aldrich | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 287,54 | 1,96 | 99 |
| Hidróxido de sódio | PronaLab | NaOH | 39,99 | --- | 98,6 |

A formação das NPsZnO, através da síntese via micro-ondas, ocorre de acordo com as equações Eq. 3.3



A síntese das nanopartículas de óxido de zinco requer a preparação de duas soluções, (i) solução de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de concentração 0,1 M e (ii) solução de NaOH com concentração de 1,6 M.

Preparadas as soluções, adicionaram-se 20 ml da solução de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 20 ml da solução de NaOH e colocou-se sob agitação vigorosa durante cerca de quarenta minutos à temperatura ambiente. A solução foi então colocada numa autoclave e levada ao micro-ondas (Samsung) durante dois minutos, sendo a potência utilizada de 300 W. Deixou-se a solução arrefecer à temperatura ambiente e de seguida filtrou-se o produto.

Centrifugou-se a suspensão obtida, com uma rotação de 4000 rpm durante cinco minutos, de modo a sedimentar todo o produto, obtendo-se assim um pó. Este processo foi repetido várias vezes de modo a se obter a máxima quantidade de ZnO e entre cada ciclo de centrifugação

procedeu-se à lavagem do produto com água destilada, sendo que no último ciclo a lavagem foi feita com isopropanol.

Por fim, deixou-se a amostra secar à temperatura ambiente durante 24 h [26].

Preparou-se uma suspensão de NPsZnO em água destilada com uma concentração de 1 mM e para uma boa dispersão do pó de ZnO recorreu-se a um sonificador (*Sonicater UP400S*, Figura 3.1).



Figura 3.1 - Sonificador: Sonicater UP400S [65]

3.2. Técnicas de impregnação e secagem do papel

Para proceder à impregnação das fibras de celulose dos papéis (*Whatman* e Filtro de café) com os diferentes tipos de nanopartículas foram, inicialmente, utilizadas diferentes técnicas de impregnação de modo a selecionar o método de impregnação mais eficaz de maneira a introduzir a maior quantidade de nanopartículas no papel. Foi também testado qual o melhor método de secagem do papel entre as diversas impregnações com as NPs de modo a se obter um elevado grau de uniformidade na impregnação do mesmo.

3.2.1. Técnicas de impregnação

Na impregnação dos substratos de papel com as nanopartículas foram cortados quadrados de dimensões 7 x 7 cm. Consoante a técnica de impregnação utilizada foram variados determinados parâmetros, como o volume de suspensão de nanopartículas depositadas, a velocidade de entrada e velocidade de saída dos papéis na suspensão de nanopartículas bem como o modo de secagem dos substratos de papel.

As técnicas de impregnação utilizadas foram o *dip-coating* (em português, revestimento por imersão), a impregnação horizontal e a pulverização com volume.

O *dip-coating* é uma técnica de impregnação que se baseia na imersão vertical dos substratos de papel na suspensão de nanopartículas em estudo, com recurso a um *dip-coater* (Figura 3.2). A técnica de *dip-coating* permite variar alguns parâmetros, como a velocidade de entrada e a velocidade de saída dos substratos de papel na suspensão de nanopartículas bem como o tempo de imersão do papel na suspensão e o volume de suspensão de nanopartículas a impregnar.

Com recurso a esta técnica foi feito variar a velocidade de saída dos substratos de papel nas suspensões de nanopartículas, sendo que foram usadas duas velocidades de saída diferentes, 10 cm/mim e 20 cm/mim. A velocidade de entrada, bem como, o tempo de imersão dos substratos de papel foram mantidos constante, sendo estes de 10 cm/mim e 5 segundos, respectivamente.



Figura 3.2 - Sistema de deposição *Dip-coater*

A técnica de impregnação horizontal é uma técnica semelhante ao *dip-coating*, onde também é usado um *dip-coater* (Figura 3.2). Contudo, nesta técnica a imersão dos substratos de papel é feita na horizontal com recurso a um suporte de arame (Figura 3.3) onde assentam os substratos de papel. Esta técnica permite variar os mesmos parâmetros que a técnica de *dip-coating*, mas apresenta algumas desvantagens, sendo esta realizada com o auxílio a um suporte de arame que permite manter os substratos de papel na horizontal, estes podem não estar perfeitamente planos podendo haver uma heterogeneidade na imersão dos substratos de papel na suspensão de NPs. Existe também a facilidade do substrato, sendo este de papel, se soltar da montagem e cair na suspensão de NPs inviabilizando assim o papel a ser impregnado. Por último, a técnica de impregnação horizontal pode trazer um maior grau de impurezas à impregnação do papel, visto que, o suporte de arame (apesar de estar revestido com *parafilm*), é imerso na suspensão de NPs e com isso a probabilidade de contaminação da suspensão aumenta.

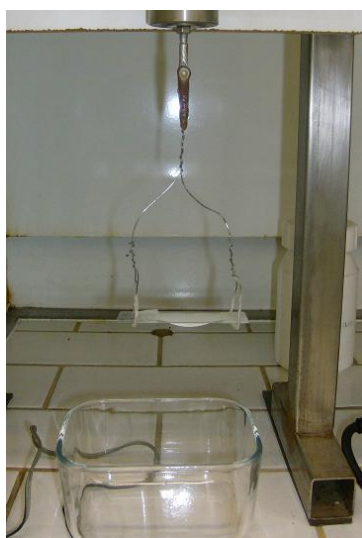


Figura 3.3 - Sistema utilizado para a impregnação horizontal dos substratos de papel

A técnica de pulverização com volume trata-se de uma técnica deposição homogênea de uma suspensão num substrato, neste estudo tratou-se da deposição das diferentes suspensões de nanopartículas nos substratos de papel com recurso a uma pistola de *spray* (Figura 3.4), um equipamento que permite a produção de pequenas gotículas em função de uma determinada pressão exercida sobre a suspensão. Nesta técnica é também possível variar os parâmetros de processo, tais como o volume de suspensão a depositar e a pressão de deposição.

A pulverização com volume é uma técnica de baixo custo e acessível em qualquer laboratório, para além de ser uma técnica que facilmente passa a uma larga escala, ou seja, de um laboratório para uma indústria. Comparando com as técnicas de *dip-coating* e impregnação horizontal, a técnica de pulverização com volume traz algumas vantagens em termos de produtividade de trabalho, uma vez que é uma técnica mais rápida, onde um mesmo volume de suspensão de nanopartículas consegue ser impregnado em menos tempo que pelas outras técnicas acima referida, para além de não existirem problemas de contaminações.



Figura 3.4 - Pistola de *spray* (TEKNO 2002 – XL 2000) utilizada na pulverização com volume;

3.2.2. Secagem do papel

Ao usar um volume de solução de nanopartículas para impregnar os substratos de papel foi necessário escolher qual o melhor modo de secagem dos substratos entre cada impregnação. Os dois modos de secagem comparados foram (i) placa de aquecimento, *Heidolph MR Hei-End* (Figura 3.5) e (ii) estufa, *EHRET-TK 4067 furnace* (Figura 3.6).



Figura 3.5 - Placa de aquecimento: Heidolph MR Hei-End [35]



Figura 3.6 - Estufa: EHRET-TK 4067 furnace [36]

A secagem dos substratos de papel era realizada após a impregnação dos substratos com a suspensão de nanopartículas. Em ambos os equipamentos utilizou-se uma temperatura de 100 °C.

Como em qualquer equipamento existem vantagens e desvantagens. Neste caso, usando a placa de aquecimento, existe um maior controlo da temperatura, sendo mais rápido um aumento ou uma redução da temperatura quando comparado com a estufa que leva um determinado tempo para atingir uma certa temperatura. Contudo a secagem dos substratos de papel, mantendo uma temperatura constante, torna-se mais rápido na estufa do que na placa de aquecimento, uma vez que na estufa o aquecimento é homogêneo, não existindo interferências com temperaturas exteriores, como é o caso da placa de aquecimento, onde a parte superior do substrato de papel se encontra em contacto com o ar e a parte inferior do substrato de papel em contacto com a placa de aquecimento. Sendo a estufa um equipamento fechado, o risco de contaminações durante a secagem do papel é inferior ao da placa de aquecimento.

3.3. Testes anti-bacterianos

Os testes anti-bacterianos foram realizados em colaboração com o Departamento de Ciências da Vida pela Professora Margarida Santos.

O tipo de teste anti-bacteriano realizado neste estudo baseia-se no método por difusão em agar [33, 66].

Este método é muito utilizado por ser um método muito simples e de rápidos resultados, contudo só fornece resultados qualitativos. O teste baseia-se na propriedade de difusão, segundo um gradiente de concentração do anti-bacteriano, que neste caso são as nanopartículas que estão impregnadas nos substratos de papel, num gel de agar nutritivo – agar Muller –Hinton (MH). Este agar oferece as condições necessárias ao crescimento das bactérias. A estirpe de bactérias cultivadas não se irá desenvolver numa área em volta do substrato de papel impregnado com as nanopartículas, se aí existirem concentrações de nanopartículas iguais ou superiores à concentração mínima inibitória e se as nanopartículas apresentarem, de facto, propriedades anti-bacterianas. Haverá, assim a formação de um halo de inibição à volta do disco, maior ou menor conforme a sensibilidade da estirpe bacteriana [33, 66].

Estes testes foram realizados com três tipos de bactérias: *Escherichia coli* DH5 α (Gram-negativa), *Staphylococcus aureus* NCTC8325 (Gram-positiva) e *Staphylococcus aureus* COL (MRSA – estirpe clínica resistente a antibióticos β -lactâmicos, como a meticilina e a penicilina), sendo que todas as nanopartículas em estudo foram testadas com os três diferentes tipos de bactérias.

3.3.1. Procedimento de preparação e análise dos testes anti-bacterianos

A metodologia para este tipo de teste encontra-se padronizada de acordo com a literatura [33, 66, 67, 68].

O agar de Muller-Hinton tem um pH que varia entre 7,2 – 7,4 e prepara-se de acordo com as indicações do fabricante. O agar foi colocado em caixas de *Petri* até uma espessura de 4 mm, de seguida preparou-se uma suspensão das bactérias em estudo e colocou-se no agar. Procedeu-se à incubação da caixa de *Petri* a 35 °C por 24 h. Após 24 h, colocaram-se os substratos de papel impregnados com as nanopartículas (quadrados de 1 x 1 cm) na caixa de *Petri* que continha a cultura de bactérias e conservou-se por 24 h a uma temperatura de 37 °C e 25 °C. Após a incubação observou-se a formação dos halos de inibição para cada um dos substratos de papel colocados na cultura de bactérias [33, 66, 67, 68].

A Tabela 3.4 resume as condições de crescimento das bactérias e a Figura 3.7 representa um exemplo dos testes anti-bacterianos realizados (a Figura 3.7 foi posteriormente tratada por forma a melhorar a sua visualização).

Tabela 3.4 - Condições de crescimento das bactérias usadas nos testes anti-bacterianos

| Condições de crescimento | |
|--------------------------|--|
| Meio | MH – meio rico utilizado em testes de susceptibilidade a antibióticos |
| Temperatura (°C) | 37 – Temperatura óptima de crescimento para estas bactérias |
| | 25 – Como não é a temperatura óptima de crescimento destas bactérias poderia aumentar a susceptibilidade aos antibióticos, além do mais pode ser a temperatura ambiente para certas aplicações |

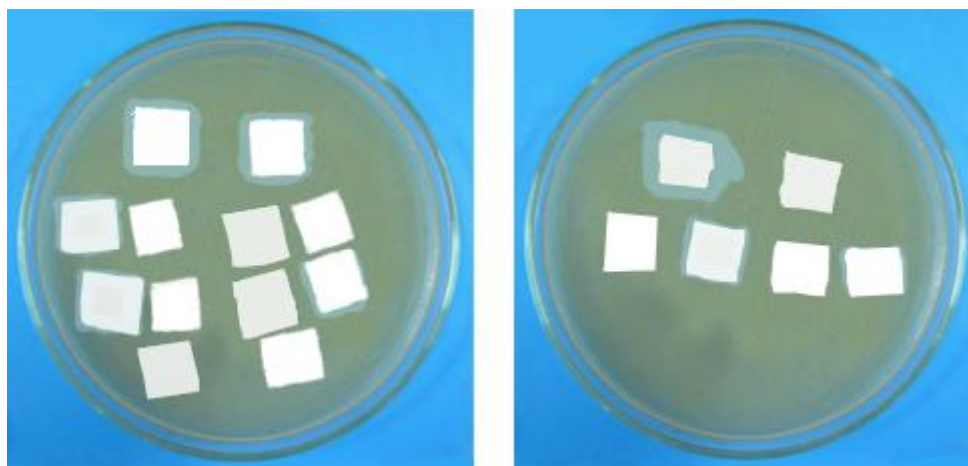


Figura 3.7 - Exemplo de cultura de bactérias usada nos testes anti-bacterianos

3.3.2. Materiais de controlo utilizados nos testes anti-bacterianos

Nos testes anti-bacterianos para além de se colocar os substratos de papel impregnados com os diferentes tipos de nanopartículas foram também usados materiais de controlo positivos comerciais (Penso *Hydrofiber* com prata – *Aquacel Ag* da *Convatec*, Figura 3.8, e Penso universal com prata da *Hansaplast*, Figura 3.9) e materiais de controlo negativos (papel de Filtro de Café, Figura 3.10, e papel *Whatman*, Figura 3.11). Nos materiais de controlo positivos é esperado um efeito de inibição. Estes serviram como materiais de referência para uma comparação entre materiais já existentes no mercado que usam nanopartículas com efeito anti-bacteriano e os papéis impregnados. Por outro lado, nos materiais de controlo negativo não é esperado um efeito inibitório, servindo estes como meio de comparação, de modo a identificar que a verdadeira causa do efeito anti-bacteriano ocorre devido às nanopartículas e não a nenhum dos constituintes dos substratos de papel em estudo.



Figura 3.8 - Controlo positivo *Aquacel Ag* [69]



Figura 3.9 - Controlo positivo *Hansaplast* [70]



Figura 3.10 - Controlo negativo papel filtro de café



Figura 3.11 - Controlo negativo papel *Whatman*

No caso das nanopartículas de prata, para verificar se o efeito bacteriano das nanopartículas de prata era efectivamente devido à prata e não devido a qualquer outro dos reagentes utilizados, foram também impregnados os dois tipos de substratos de papel utilizados com uma solução de nitrato de potássio (KNO_3), com uma concentração de 1 mM, com citrato de sódio e outros dois substratos de papel com o borohidreto de sódio de modo a garantir que a reacção ocorria da mesma forma e que a actividade anti-bacteriana era devida à prata. Estes materiais também serviram como materiais de controlo negativo.

A solução de nitrato de potássio com citrato de sódio e a solução de nitrato de potássio com borohidreto de sódio foram realizadas da mesma forma que os procedimentos explicados na secção 3.1.1 a).

Capítulo 4: Apresentação e discussão de resultados

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos ao longo de todas as etapas de trabalho. Será apresentada e discutida a caracterização morfológica e estrutural dos dois substratos de papel, dos três diferentes tipos de nanopartículas bem como do papel impregnado com as nanopartículas. Através da caracterização dos substratos de papel impregnados com as NPs será selecionada a melhor técnica de impregnação dos substratos. Por fim, serão apresentados os resultados dos testes anti-bacterianos realizados, realçando um dos parâmetros: a concentração.

4.1. Caracterização dos substratos de papel

O trabalho apresenta a funcionalização de fibras de celulose com diferentes tipos de nanopartículas, com o objectivo de se obter substratos de papel com actividade anti-bacteriana, sendo a sua selecção e caracterização de especial importância.

Foram estudados e caracterizados dois substratos de papel diferentes: (i) papel de cromatografia *Whatman* nº1 (*Filter Papers*; Cat No. 1001 150) e (ii) papel de filtro para café (*Home7*; Pingo Doce Distribuição Alimentar, S.A.), os papéis testados apresentam algumas diferenças entre si, como por exemplo o tipo e quantidade de fibras ou o próprio método de produção.

Iniciando o estudo e caracterização dos substratos de papel utilizados através de uma abordagem macroscópica e recorrendo à tabela 4.1, verifica-se que o papel *Whatman* se apresenta como um papel mais denso, o que revela uma menor existência de espaços vazios entre as fibras de celulose, tornando-o um papel menos poroso quando comparado com o papel de filtro de café. O papel de filtro de café apresenta uma menor espessura, o que se pode comprovar pelos valores apresentados pela tabela 4.1.

O papel de filtro de café, para ser usado na produção de café, requer propriedades hidrofílicas o que exige uma maior quantidade de poros entre as fibras de celulose, de forma a permitir uma boa filtração do café. Assim, este tipo de papel é considerado mais poroso, ou seja, menos compacto e menos denso quando comparado com o papel *Whatman*.

Tabela 4.1 - Propriedades macroscópicas dos diferentes substratos estudados [11]

| Propriedades | Papel <i>Whatman</i> | Papel de Filtro de Café |
|--------------------------------|----------------------|-------------------------|
| Gramagem (g/m ²) | 88 | 51 |
| Espessura (µm) | 180 | 125 |
| Densidade (kg/m ³) | 489 | 408 |
| Porosidade (%) | 68,2 | 73,5 |
| Poros médio (µm) | 11 | - |

4.1.1. Caracterização morfológica

• Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento (SEM) permite caracterizar morfológicamente a superfície dos substratos de papel onde foram depositadas as nanopartículas.

A unidade estrutural do papel são as fibras de celulose que, pela análise SEM da Figura 4.1, são formadas por várias células individuais compostas por microfibrilas dispostas em camadas de diferentes espessuras e ângulos de orientação. As fibras de celulose apresentam uma forma tubular com cerca de 1,5 mm de comprimento, 20 µm de diâmetro e 2 µm de espessura [11, 71].

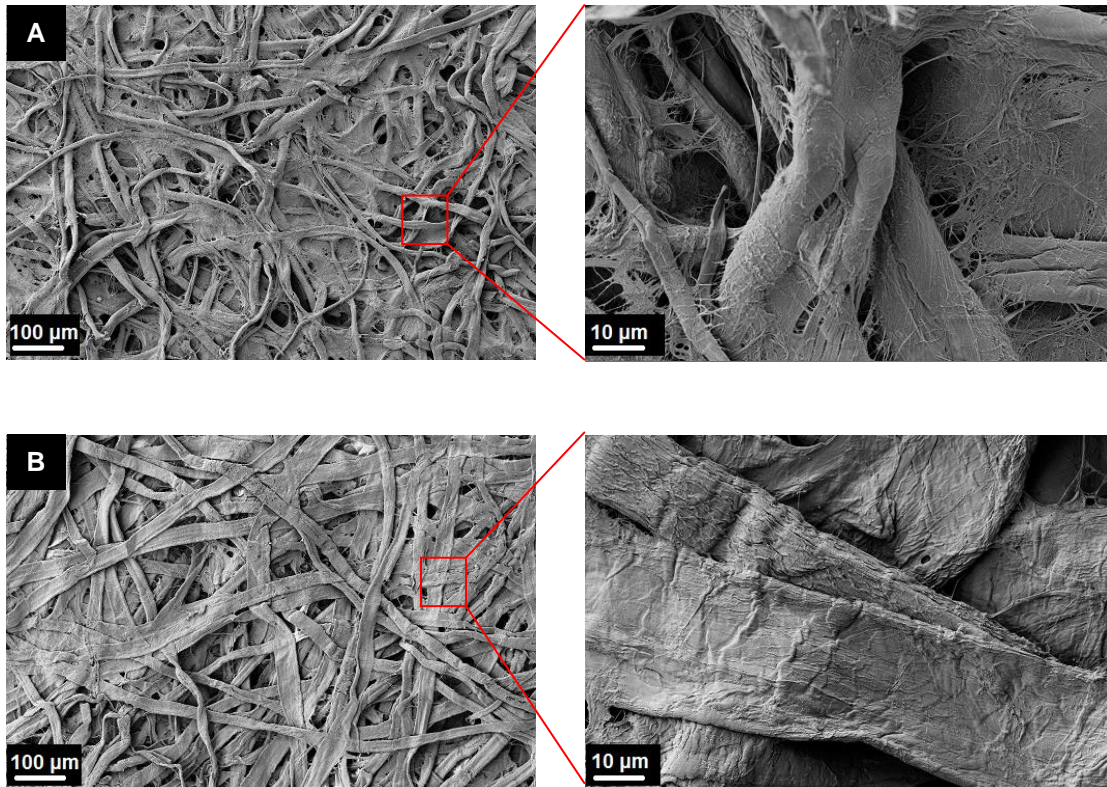


Figura 4.1 - Imagens de SEM dos substratos de papel: A) papel *Whatman*; B) papel de filtro de café

Pela observação das imagens SEM constatou-se que os resultados estão de acordo com a literatura [2, 6, 11], ou seja, que o elemento principal na constituição de ambos os papéis em estudo é uma malha tridimensional de fibras de celulose. Pela comparação dos papéis observa-se que ambos apresentam um emaranhado de fibras, morfologia irregular e formam uma estrutura porosa semelhante (Figura 4.1 A e B), diferenciada na geometria das fibras. Observando a figura 4.1 A, verifica-se que o papel *Whatman* apresenta fibras com uma geometria cilíndrica enquanto as fibras que constituem o papel de filtro de café apresentam uma geometria mais achatada (Figura 4.1 B). Tal facto pode justificar o maior valor de espessura apresentado pelo papel *Whatman* tal como mostrado na tabela 4.1. Comparando a figura 4.1 A e B, observa-se que entre as fibras de celulose de maior tamanho, do papel *Whatman*, existe uma teagem de fibras de menores tamanhos que fazem a ligação entre ambas, algo que não se observa na estrutura morfológica do papel de filtro de café.

• Perfilometria 3D

Uma outra técnica de caracterização dos substratos de papel utilizada foi a perfilometria. Através desta técnica obteve-se valores de rugosidade bem como imagens topográficas 3D (Figura 4.2 A e B) dos substratos de papel em estudo. A Tabela 4.2 apresenta os valores de rugosidade obtidos.

Tabela 4.2 - Valores de rugosidade de ambos os substratos de papel

| | Papel <i>Whatman</i> | Papel Filtro de café |
|---|----------------------|----------------------|
| Rugosidade média (μm) | 11,4 | 6,6 |
| Rugosidade RMS (μm) | 14,3 | 8,1 |
| Altura máxima de pico (μm) | 80,9 | 54,5 |

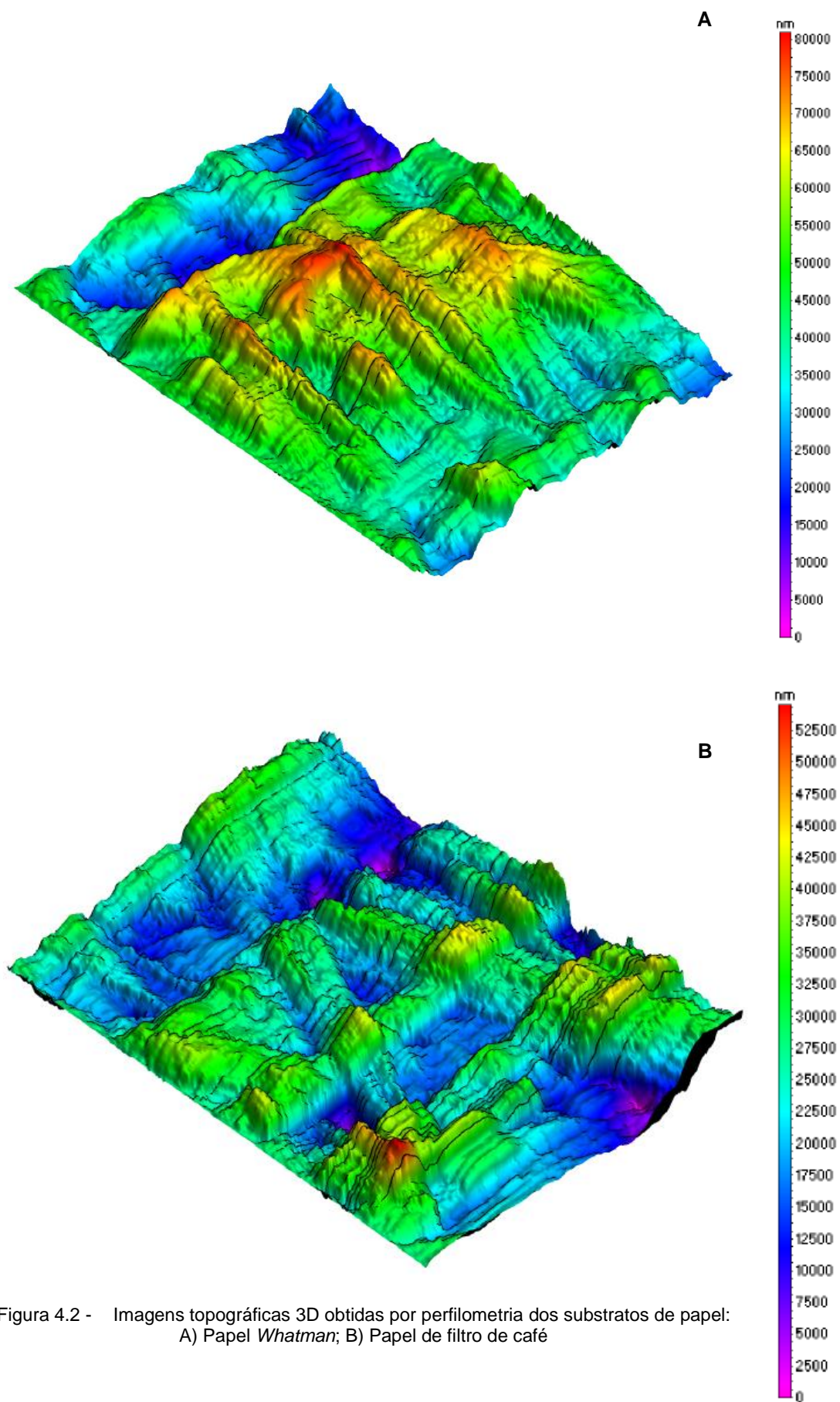


Figura 4.2 - Imagens topográficas 3D obtidas por perfilometria dos substratos de papel:
A) Papel *Whatman*; B) Papel de filtro de café

Verifica-se que o papel *Whatman* apresenta um maior valor de rugosidade RMS comparando ao papel de filtro de café, sendo este valor de 14,3 μm e 8,1 μm , respectivamente. O valor de rugosidade superior para o papel *Whatman* observa-se também, pela Figura 4.2 A e B, onde a altura máxima do pico do papel *Whatman* é bastante superior à altura do pico do papel de filtro de café. É possível observar no papel de filtro de café uma maior uniformidade em termos de rugosidade, onde o valor não apresenta uma variação tão grande ao longo do plano em estudo, como no caso do papel *Whatman* que, para uma mesma área, se observam maiores mudanças de rugosidade.

4.1.2. Caracterização composicional e estrutural

• Difracção de raios-X

Os dois substratos de papel em estudo foram analisados pela técnica de difracção de raios-X que permite fazer uma identificação estrutural dos substratos, de modo a reconhecer as diferenças na estrutura cristalina de cada um deles. Na Figura 4.3, encontram-se os difractogramas obtidos.

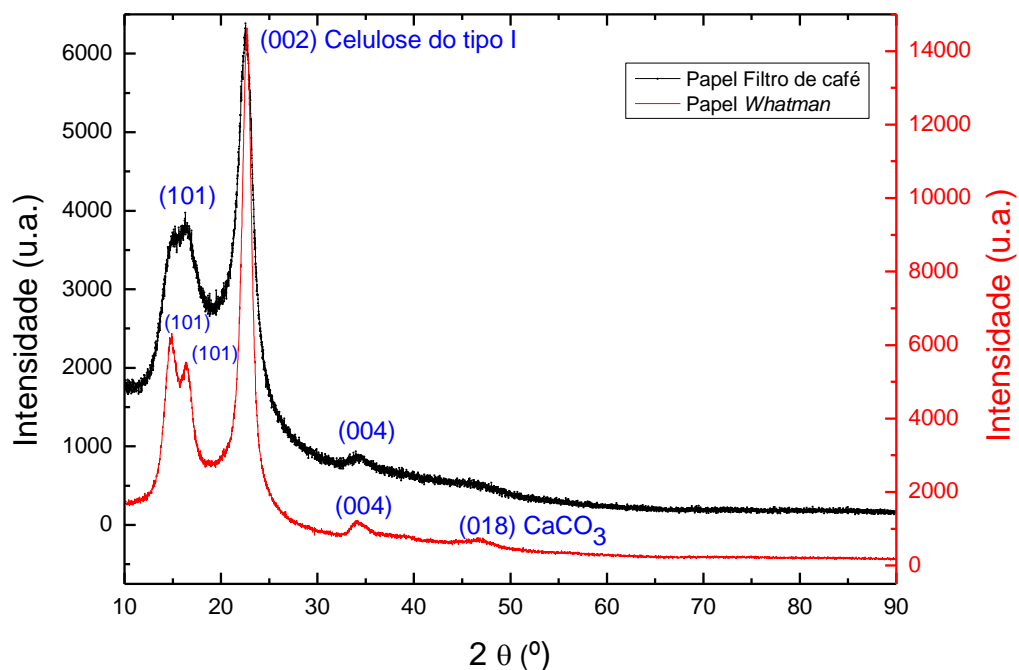


Figura 4.3 - Difractogramas obtidos para o papel *Whatman* e papel de filtro de café

Pela análise dos difractogramas, verifica-se que ambos os substratos de papel apresentam os mesmos picos de cristalinidade, característicos da estrutura cristalina da celulose do tipo I [11, 72, 73]. Na Figura 4.3 identificam-se os quatro picos a 14,8°; 16,4°; 22,6°; 34,3° de 2θ , comuns aos dois papéis. Contudo, o papel *Whatman* apresenta um quinto pico de ângulo 46,7°, representativo do carbonato de cálcio (calcite – CaCO_3) [11, 74] que é um aditivo comum no fabrico do papel, uma vez que melhora as propriedades de opacidade e brilho do papel, através da formação de aglomerados leves e porosos [74]. Na Tabela 4.3, apresenta-se os correspondentes planos cristalográficos dos picos de difracção identificados.

Tabela 4.3 - Picos de ângulos e planos cristalográficos representativos dos dois substratos de papel

| 2θ (°) | Plano cristalográfico | Composto |
|--------|-----------------------|---------------------|
| 14,8 | (101) | Celulose tipo I |
| 16,4 | (101) | |
| 22,6 | (002) | |
| 34,3 | (004) | |
| 46,7 | (018) | Carbonato de cálcio |

Pela análise do difractograma observa-se ainda que os picos de ângulos a 14,8° e 16,4° são mais definidos no caso do papel *Whatman* em comparação com o papel de filtro de café. Tal relaciona-se com o conteúdo de celulose, ou seja, quando as fibras de celulose contém elevadas quantidades de materiais amorfos, como por exemplo lenhina e hemicelulose, típico das fibras de celulose provenientes da madeira, estes dois picos fundem-se, aparecendo um único pico largo. No caso do papel de filtro de café, estes picos são menos definidos o que indica que o papel *Whatman* é um substrato com fibras mais ricas em celulose (fibras naturais) que o papel de filtro de café, devido ao facto deste papel ser utilizado em aplicações mais exigentes que necessitam de um maior grau de purificação [6, 11, 72].

Através do método empírico de *Segal* [72] é possível calcular o índice de cristalinidade (*ICr*) dos dois tipos de papéis estudados, a partir da equação Eq. 4.1:

$$ICr (\%) = \frac{I_{(002)} - I_{(am)}}{I_{(002)}} \times 100 \quad \text{Eq. 4.1}$$

Onde $I_{(002)}$ é o valor da intensidade máxima do pico observado para o ângulo $2\theta = 22,6^\circ$, que representa a componente cristalina dos substratos em estudo; $I_{(am)}$ é o valor da intensidade de difracção verificada a um ângulo $2\theta = 18^\circ$, que representa a componente amorfa dos papéis em estudo. Na Tabela 4.4 encontram-se os valores do índice de cristalinidade calculados para os diferentes substratos utilizados.

Tabela 4.4 - Índice de cristalinidade dos diferentes papéis

| Tipo de papel | Índice de cristalinidade (%) |
|----------------|------------------------------|
| <i>Whatman</i> | 81,7 |
| Filtro de café | 58,3 |

Pela Tabela 4.4 verifica-se que o papel *Whatman* apresenta um maior índice de cristalinidade, o que é expectável devido à relação dos picos de cristalinidade dos ângulos 14,8° e 16,4°, onde se observa que o papel de filtro de café tem na sua constituição outros elementos como a lenhina e hemicelulose.

Na fabricação do papel, diversos tratamentos mecânicos e químicos são usados para purificar as fibras de celulose e eliminar materiais amorfos, tais como a lenhina e a hemicelulose. Este tipo de processo pode alterar a estrutura das fibras de celulose, convertendo a celulose do tipo I para celulose do tipo II. Contudo e apesar de se verificar alguma discrepância nos índices de cristalinidade obtidos para este dois papéis, os valores de cristalinidade são elevados, confirmando assim que os papéis são maioritariamente constituídos por celulose do tipo I, tal como foi identificada pelos picos característicos no difractograma. A diferença dos índices de cristalinidade pode estar relacionada com o processo de fabrico, como por exemplo no tipo de tratamentos efectuados para as aplicações específicas a que são destinados estes tipos de papel.

4.2. Caracterização dos diferentes tipos de nanopartículas sintetizadas

Na funcionalização das fibras de celulose foram utilizados diferentes tipos de nanopartículas tais como nanopartículas de prata, de óxido de zinco e de óxido de cobre. As nanopartículas utilizadas foram nanopartículas comerciais e nanopartículas sintetizadas.

De seguida, apresentam-se os resultados relativos à caracterização morfológica e estrutural das nanopartículas de prata e nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas.

4.2.1. Nanopartículas de prata

No estudo das nanopartículas de prata foram sintetizados dois tipos de nanopartículas, ambas através de sínteses químicas variando apenas o agente redutor utilizado, onde num caso foi realizada uma síntese via citrato de sódio e noutro uma síntese via borohidreto de sódio.

4.2.1.1. Caracterização morfológica

- **Microscopia electrónica de transmissão**

Com a possibilidade que ocorreu durante o trabalho de utilizar o microscópio electrónico de transmissão (TEM), estudou-se a morfologia das nanopartículas de prata sintetizadas pelas duas vias. A Figura 4.4 A e B mostra as imagens obtidas por esta técnica.

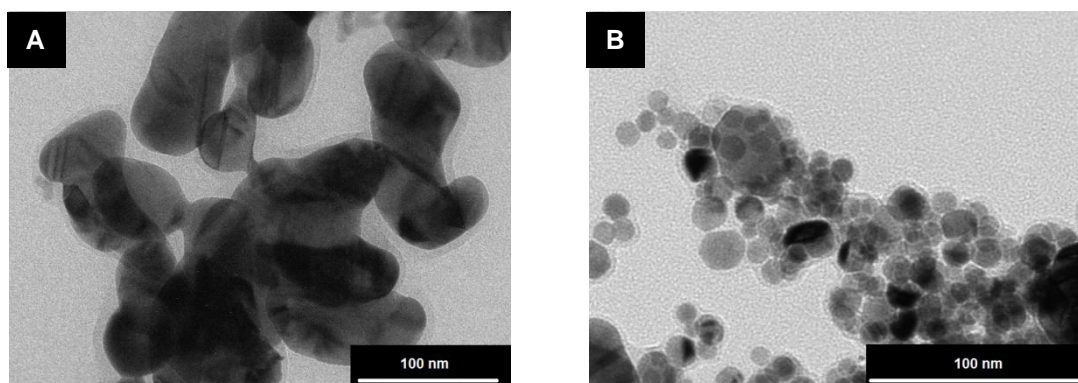


Figura 4.4 - Imagens obtidas por TEM das NPsAg: A) via citrato de sódio; B) via borohidreto de sódio

Pela análise em TEM, verifica-se que as nanopartículas obtidas por síntese química via citrato de sódio apresentam um tamanho de aproximadamente 100 nm, sendo este superior ao das nanopartículas obtidas via borohidreto de sódio cujo tamanho varia entre os 10 e os 50 nm.

As nanopartículas sintetizadas via citrato de sódio mostram uma morfologia em forma de bastonetes, sendo que algumas nanopartículas apresentam uma geometria esférica tal como as nanopartículas de prata via borohidreto de sódio. Observa-se alguns aglomerados de partículas, principalmente no caso da síntese via citrato de sódio, o que também poderá estar relacionado com o maior tamanho das nanopartículas. No caso das nanopartículas de prata sintetizadas via borohidreto de sódio, verifica-se uma menor quantidade de aglomerados, existindo uma melhor dispersão das nanopartículas.

4.2.1.2. Caracterização óptica, composicional e estrutural

- **Espectrofotometria ultravioleta - visível**

Com recurso à técnica de espectrofotometria ultravioleta – visível foi possível a caracterização óptica das nanopartículas de prata sintetizadas. De acordo com a literatura [64] é possível determinar o tamanho das nanopartículas de prata consoante o seu pico de absorvância e o seu comprimento de onda. A técnica espectrofotometria UV-visível permitiu a obtenção de um espectro que relaciona a absorvância e o comprimento de onda das nanopartículas de prata de forma a determinar o tamanho médio das nanopartículas.

Na Figura 4.5 estão representadas as medidas de absorvância para os dois tipos de nanopartículas de prata sintetizadas cuja concentração é 1 mM. Os espectros foram obtidos no intervalo de comprimento de onda entre os 290 – 700 nm.

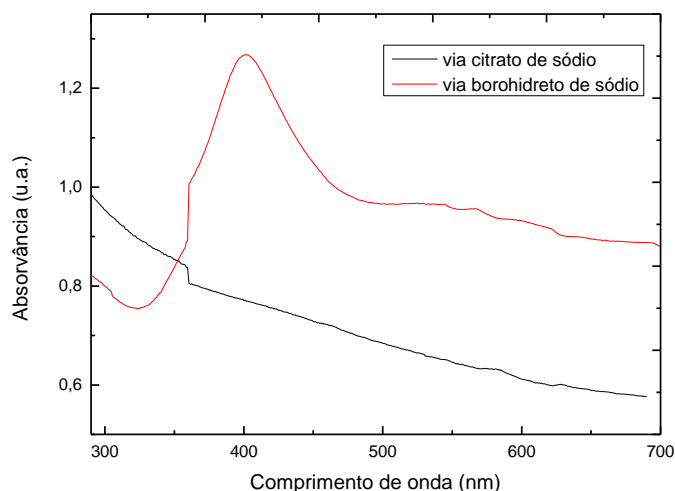


Figura 4.5 - Espectro de absorvância das NPsAg sintetizadas via citrato de sódio e via borohidreto de sódio

Como foi mencionado, de acordo com a literatura [64], foram já descritos intervalos de tamanhos para as NPsAg que rondam os 395 – 438 nm. Neste intervalo de comprimentos de onda, com o aumento do tamanho das nanopartículas o pico do espectro de absorvância desvia-se para maiores valores de comprimentos de onda. Pelo espectro de absorvância obtido verifica-se que as nanopartículas de prata via borohidreto de sódio apresentam um pico cujo máximo de absorvância ocorre a um comprimento de onda de 401,5 nm verificando-se, de acordo com o autor acima referido [64], que o tamanho das NPsAg deverá estar entre os 10 – 14 nm, o que está de acordo com as imagens de TEM acima mostradas (Figura 4.4 B). Verifica-se então que nesta síntese não houve agregação das nanopartículas, sendo que estas se mantiveram dispersas e com um tamanho pequeno.

Através da análise da Figura 4.5 verifica-se que a solução de NPsAg via citrato de sódio apresenta dois ligeiros picos relativos aos comprimentos de onda a 581,5 nm e 627,5 nm, que correspondem a uma absorvância de 0,63 e 0,60, respectivamente. Relacionando os picos identificados na Figura 4.5 a partículas de grande dimensão (> 100 nm, fora da classificação de nanopartículas), o que poderá estar relacionado com a possível agregação das nanopartículas, tal como se pode ver nas imagens de TEM acima apresentadas (Figura 4.4 A).

• Dispersão de luz dinâmica

Neste estudo a técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) foi utilizada na determinação do tamanho das nanopartículas. Esta medida foi feita para os três tipos de nanopartículas de prata em estudo (nanopartículas sintetizadas logo após a sua síntese, e comerciais da *PlasmaChem*).

Através da técnica de DLS foram obtidos valores do tamanho das nanopartículas de prata sintetizadas via citrato de sódio de 84 ± 15 nm e para as NPs sintetizadas via borohidreto de sódio de 22 ± 13 nm, valores que estão de acordo com os valores estimados através das imagens de TEM (Figura 4.4 A e B). Para as nanopartículas de prata comerciais o tamanho obtido foi de 7 ± 1 nm, valor este que se identifica com as especificações do fornecedor que revelam um valor de 10 nm para estas nanopartículas.

➤ Teste de envelhecimento

No presente estudo foi realizado um teste de envelhecimento a cinco suspensões de nanopartículas de prata via citrato de sódio, cuja concentração foi de 0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM; 5 mM e 10 mM.

O teste de envelhecimento contribuiu para aferir sobre a estabilidade das suspensões de nanopartículas de prata consoante a sua concentração, ou seja, estudou-se, com o passar do tempo, o maior ou menor grau de aglomeração das nanopartículas de prata e com isso o aumento do tamanho das nanopartículas de prata.

A Figura 4.6 mostra os valores dos tamanhos obtidos ao longo de três meses para estas nanopartículas.

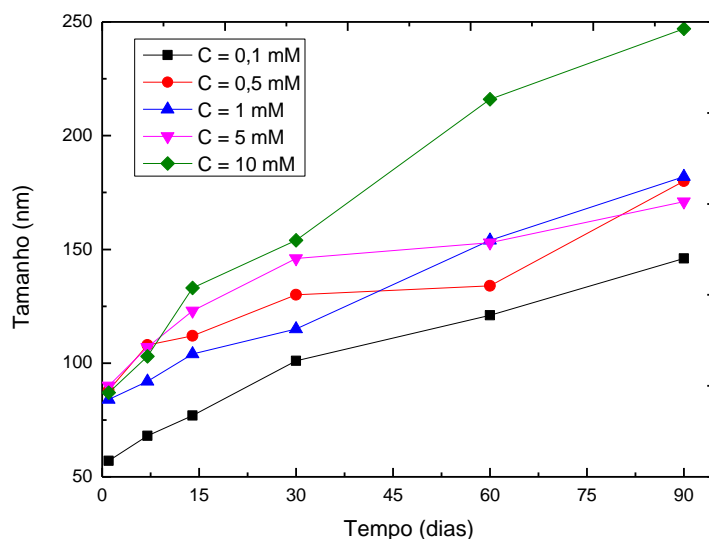


Figura 4.6 - Medidas de DLS do teste de envelhecimento para as NPsAg via citrato de sódio

Pela análise da Figura 4.6, verifica-se que houve um aumento do tamanho em todas as suspensões de nanopartículas de prata ao longo do tempo. Este fenómeno está provavelmente relacionado com a agregação das nanopartículas, o que era expectável devido ao facto de neste tipo de síntese não ter sido utilizado qualquer tipo de estabilizador. Como foi já mencionado, os estabilizadores são compostos utilizados na síntese de vários tipos de NPs que ajudam na sua estabilização e posterior manipulação de forma a evitar a aglomeração das nanopartículas.

Pelo teste de envelhecimento observa-se que a suspensão de menor concentração (0,1 mM) apresenta um menor aumento do tamanho das nanopartículas de prata, ao contrário do que se observa na suspensão de maior concentração (10 mM) onde o tamanho das nanopartículas sofreu um grande aumento. Observa-se um aumento da agregação das nanopartículas com o aumento da concentração devido aos teores de prata existentes na suspensão, tornando menos estáveis as suspensões de maiores concentrações.

No caso das suspensões de 0,5 mM; 1 mM e 5 mM verifica-se que ocorreu um aumento do tamanho das nanopartículas, contudo este aumento não foi tão pronunciado podendo dizer-se que nestas concentrações as nanopartículas de prata são mais estáveis mesmo sem o uso de qualquer tipo de estabilizadores.

• Difracção de raios-X

A técnica de difracção de raios-X (DRX) permitiu identificar diferenças na estrutura cristalina dos dois tipos de nanopartículas de prata sintetizadas e calcular o tamanho da cristalite. Ambas as suspensões tinham uma concentração de 1 mM e os difractogramas foram adquiridos para ângulos de 2θ entre os 20° - 60° para as NPsAg via citrato de sódio e para ângulos de 2θ entre os 35° - 60° para as nanopartículas de prata via borohidreto de sódio. Os difractogramas são seguidamente apresentados (Figura 4.7).

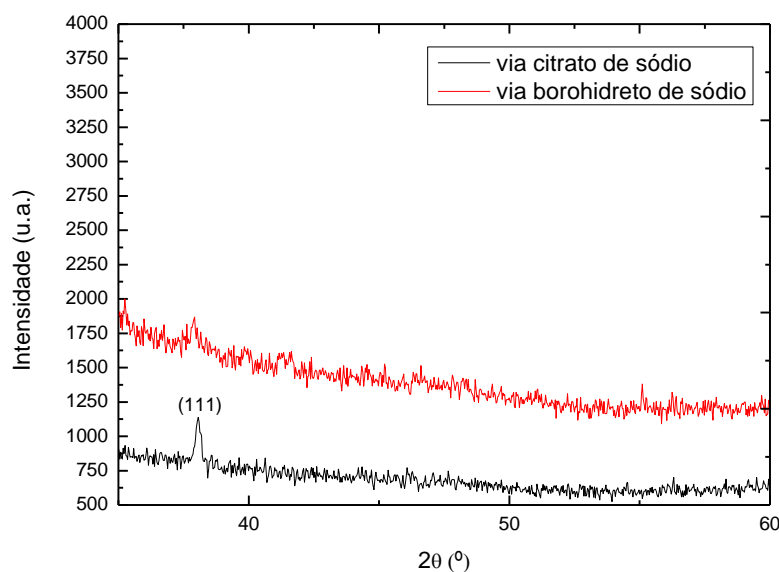


Figura 4.7 - Difractogramas obtido pela técnica de DRX para as NPsAg sintetizadas via citrato de sódio e via borohidreto de sódio

Pela análise na literatura [75, 76, 77] sabe-se que os picos característicos da estrutura cúbica de faces centradas da prata são correspondentes aos ângulos de 2θ a 38° , 44° , 64° , 77° , 82° que correspondem aos planos cristalográficos (111), (200), (220), (311), (222), respectivamente.

Pela análise da Figura 4.7 verifica-se que as nanopartículas de prata sintetizadas via borohidreto de sódio apresentam um difractograma com algum ruído, podendo identificar-se uma estrutura praticamente amorfa que não se identifica com a estrutura cristalina correspondente à prata. Porém, identifica-se um ligeiro pico aos 38° , que corresponde ao plano cristalográfico (111), e que é um dos picos característicos da estrutura cristalina da prata.

No difractograma obtido para as NPsAg via citrato de sódio observa-se um pico no ângulo a 38° , sendo este último característico da estrutura cristalina da prata.

Através da equação Eq. 4.2, que se trata da equação de *Debye-Scherrer* [75, 77], é possível calcular o tamanho das nanopartículas de prata obtidas:

$$\delta = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta_{hkl}} \quad \text{Eq. 4.2}$$

Onde K é o factor de forma (0,9), λ é o comprimento de onda ($1,5406 \text{ \AA}$); β é a medida da largura de um pico de difracção no ponto onde a intensidade cai para metade e θ_{hkl} trata-se do ângulo de difracção de *Bragg*, em radianos.

O cálculo do tamanho de cristalite foi apenas realizado para as nanopartículas de prata via citrato de sódio, devido ao facto do difractograma obtido para as nanopartículas de prata via borohidreto de sódio apresentar algum ruído, onde o único pico identificado não se apresenta bem definido.

Para as nanopartículas de prata via citrato de sódio foi usado, no cálculo do tamanho da cristalite, o pico do ângulo a 38° que corresponde a $\beta = 0,1337^\circ$. O valor obtido foi de $78,9 \text{ nm}$, valor que se aproxima com os valores estimados pelas imagens de TEM e com os valores obtidos pela técnica de DLS.

4.2.2. Nanopartículas de óxido de zinco

Neste estudo foram também utilizadas nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas por aquecimento via micro-ondas e dois tipos diferentes de nanopartículas de óxido de zinco

comerciais; NPsZnO em pó (*PlasmaChem*; ZnO-nanopowder, Ca. 14 nm) e em suspensão aquosa (*Evonik*; VP Disp. ZnO 20 DW). Todas as suspensões de NPsZnO foram utilizadas numa concentração de 1 mM.

De seguida, apresenta-se a caracterização morfológica, composicional e estrutural das nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas.

4.2.2.1. Caracterização morfológica

- **Microscopia electrónica de varrimento**

Para a caracterização morfológica das nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas utilizou-se o microscópio electrónico de varrimento (SEM).

A Figura 4.8 refere-se à imagem obtida das nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas.



Figura 4.8 - Imagens de SEM das NPsZnO sintetizadas

Pela literatura [26], através da síntese por aquecimento via micro-ondas, era de esperar a obtenção de nanopartículas de óxido de zinco de morfologia esférica bem dispersas e com um tamanho entre os 10 – 15 nm. Pela observação da Figura 4.8 das nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas pelo mesmo método, obtiveram-se NPs bastante aglomeradas formando estruturas laminares e com um tamanho que não se refere a nanopartículas devido à elevada aglomeração das partículas.

A diferença dos resultados obtidos pode estar relacionada com diferentes parâmetros utilizados na síntese das nanopartículas, como por exemplo no tipo de micro-ondas utilizado, potência, temperatura entre outros.

4.2.2.2. Caracterização óptica, composicional e estrutural

- **Espectrofotometria ultravioleta – visível**

O espectro de absorvância das nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas foi obtido para valores de comprimento de onda no intervalo de 290 – 700 nm e é seguidamente apresentado na Figura 4.9.

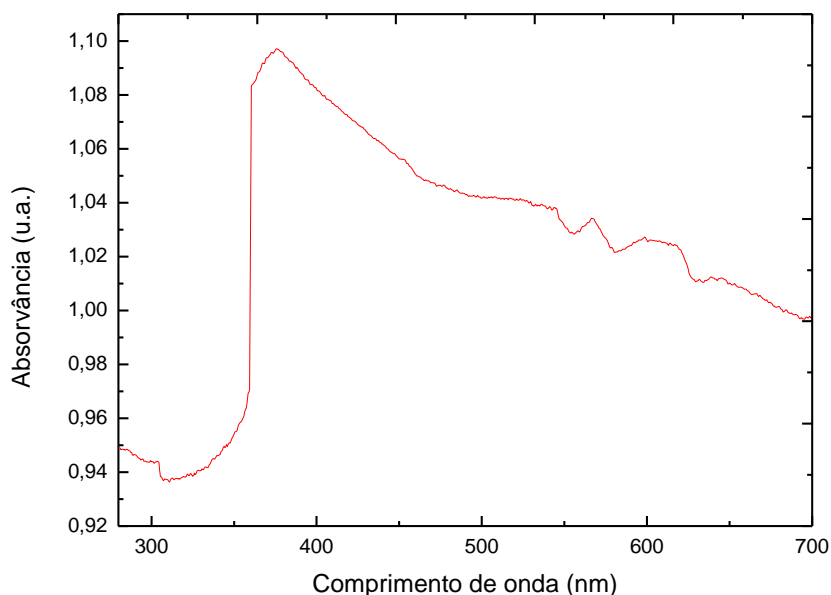


Figura 4.9 - Espectro de absorvância das NPsZnO sintetizadas

O espectro de absorvância obtido para as NPsZnO sintetizadas apresenta um deslocamento da banda de absorção para o azul onde se verifica um pico de absorvância aos 376 nm. Pela literatura [26, 78], este pico é característico dos sólidos de óxido de zinco e ocorre a baixos comprimentos de onda onde o tamanho das partículas se encontra num regime de efeito de confinamento quântico.

- **Dispersão de luz dinâmica**

Através da técnica de DLS foi medido o tamanho das nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas. Obteve-se o valor de 200 ± 48 nm, valor que não se encontra de acordo com a literatura seguida [26] onde se apresenta um tamanho das nanopartículas de óxido de zinco entre os 10 – 15 nm.

Tal facto pode ser devido à agregação das nanopartículas, possivelmente devido ao tipo de síntese onde o rápido aquecimento da suspensão, através da irradiação micro-ondas, provoca um aumento na velocidade da reacção química levando a alterações na forma e tamanho das nanopartículas obtidas [26].

- **Difracção de raios-X**

O difractograma da suspensão de nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas, com concentração de 1 mM, foi obtido para valores de ângulos de 2θ entre os 10° - 90° e é seguidamente apresentado na Figura 4.10.

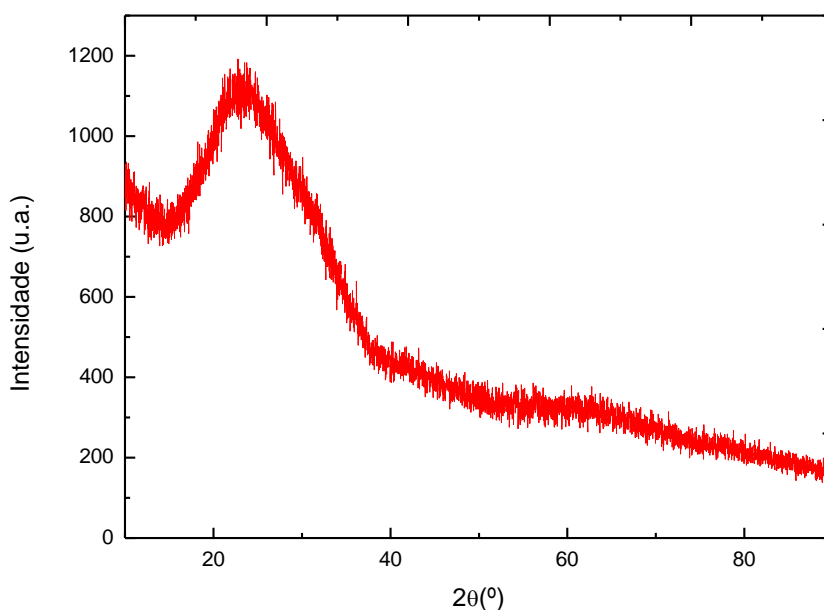


Figura 4.10 - Difractograma obtido pela técnica de DRX para as NPsZnO sintetizadas

O difractograma obtido para as nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas é de um material amorfo, não correspondendo aos difractogramas típicos para as NPsZnO [24, 25, 26]. Tal facto pode ser devido à reduzida quantidade de nanopartículas existentes na suspensão preparada, não permitindo assim uma boa identificação da estrutura cristalina deste tipo de material. De acordo com a literatura [24, 25, 26] os picos característicos da estrutura cristalina hexagonal das NPsZnO ocorrem nos ângulos de 2θ a $31,7^\circ$; $34,4^\circ$; $36,2^\circ$; $47,5^\circ$; $56,6^\circ$; $62,8^\circ$; $66,4^\circ$; $67,9^\circ$; $69,1^\circ$; que correspondem aos planos cristalográficos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), respectivamente.

4.3. Selecção do modo de secagem e das técnicas de impregnação das nanopartículas às fibras de celulose

Inicialmente foi estudado qual o melhor modo de secagem dos substratos de papel de forma a se obter uma secagem uniforme sem danificar os papéis.

Após a determinação do melhor modo de secagem dos substratos, foram testadas as três técnicas de impregnação, *dip-coating*, impregnação horizontal e pulverização com volume nos dois substratos de papel (*Whatman* e filtro de café) de modo a determinar qual a técnica de impregnação mais eficaz.

4.3.1. Secagem dos substratos de papel

Por ser uma técnica onde se definiu um volume de suspensão de nanopartículas a impregnar nos substratos de papel, através da técnica de pulverização com volume foi testado qual o melhor modo de secagem dos papéis. Neste estudo foram utilizados dois modos de secagem: i) placa de aquecimento e ii) estufa. Em ambos os equipamentos utilizou-se uma temperatura de 100°C e os substratos de papel tinham uma área de $5 \times 2,5$ cm.

As figuras em baixo mostram os resultados obtidos da secagem dos substratos de papel utilizando a placa de aquecimento (Figura 4.11 A e B) e a estufa (Figura 4.12 A e B).



Figura 4.11 - Secagem dos papéis na placa de aquecimento: A) *Whatman*; B) Filtro de café



Figura 4.12 - Secagem dos papéis na estufa: A) *Whatman*; B) Filtro de café

Pela observação da Figura 4.11 A e B verifica-se que os substratos de papel perdem a sua aparência lisa/plana passando para uma disposição mais enrugada do tipo ondulatória, devido à secagem dos substratos na placa de aquecimento. Este tipo de estrutura ondulatória faz com que as novas deposições de nanopartículas não sejam homogêneas, provocando um aglomerar de NPs nas zonas mais enrugadas. Tal efeito observa-se na Figura 4.11 A que apresenta uma zona mais amarelada onde existe uma maior quantidade de nanopartículas impregnadas em comparação com as regiões adjacentes a esta. Atendendo a este efeito concluiu-se que a secagem na placa de aquecimento não permitia uma boa dispersão da suspensão em todo o substrato de papel.

Por outro lado, ao realizar a secagem dos substratos de papel na estufa, verifica-se pela Figura 4.12 A e B, que os papéis mantêm a sua aparência inicial. O aquecimento na estufa ao ser homogêneo, onde não existe qualquer tipo de interferência com temperaturas exteriores, provoca uma secagem uniforme dos substratos de papel não danificando nem alterando o seu tipo de estrutura, tornando assim as seguintes deposições das nanopartículas homogêneas.

Através destes resultados optou-se pela secagem dos substratos de papel na estufa, de modo a se obter o máximo de uniformidade das deposições em todo o substrato sem o danificar nem alterar a sua estrutura inicial.

4.3.2. Técnicas de impregnação

Para seleccionar qual ou quais as melhores técnicas de impregnação das nanopartículas nos substratos de papel procedeu-se a uma caracterização dos papéis depois de impregnados, através de SEM. Devido ao facto de se iniciar o estudo com as nanopartículas de prata, a selecção das técnicas de impregnação foi realizada através deste tipo de nanopartículas. As figuras de seguida apresentadas referem-se à impregnação dos dois substratos de papel utilizados com as nanopartículas de prata via citrato de sódio (Figura 4.13) e nanopartículas de prata via borohidreto de sódio (Figura 4.14).

Na técnica de *dip-coating* o parâmetro variado foi a velocidade de saída dos substratos de papel da suspensão de nanopartículas, de modo a determinar-se com o aumento ou diminuição da velocidade de saída ocorria alguma alteração na quantidade de nanopartículas impregnadas nos papéis. A velocidade de entrada utilizada foi de 10 cm/min e a velocidade de

saída de 10 cm/min (Figura 4.13 A1 e A2 e Figura 4.14 A1 e A2) e 20cm/min (Figura 4.13 B1 e B2 e Figura 4.14 B1 e B2) onde em ambos os casos, o tempo de imersão dos substratos de papel na suspensão de nanopartículas foi de 5 segundos e foi apenas realizada uma imersão na suspensão para cada uma das velocidades de saída.

Na técnica de impregnação horizontal não foram variados parâmetros. A velocidade de entrada e a velocidade de saída dos substratos de papel na suspensão de nanopartículas foi mantida constante sendo de 10 cm/min, o tempo de imersão dos substratos de papel foi de 5 segundos e foi realizada uma única imersão na suspensão de nanopartículas (Figura 4.13 C1 e C2 e Figura 4.14 C1 e C2).

Como os parâmetros utilizados nesta técnica foram iguais aos utilizados na técnica de *dip-coating* conseguiu-se um termo de comparação entre o modo de impregnação vertical (figura 4.13 A1 e A2 e Figura 4.14 A1 e A2) e horizontal (Figura 4.13 C1 e C2 e Figura 4.14 C1 e C2), permitindo verificar em qual das técnicas se conseguia uma maior impregnação dos substratos de papel com as nanopartículas de prata via citrato de sódio e via borohidreto de sódio.

A técnica de pulverização com volume permite a variação de um parâmetro que nas técnicas anteriormente referidas não foi tido em conta, o volume. Nesta técnica foram depositados 14 ml de suspensão de nanopartículas de prata nos substratos de papel de tamanho 7 x 7 cm. Entre cada deposição da suspensão de nanopartículas procedeu-se à secagem dos substratos de papel na estufa (Figura 4.13 D1 e D2 e Figura 4.14 D1 e D2).

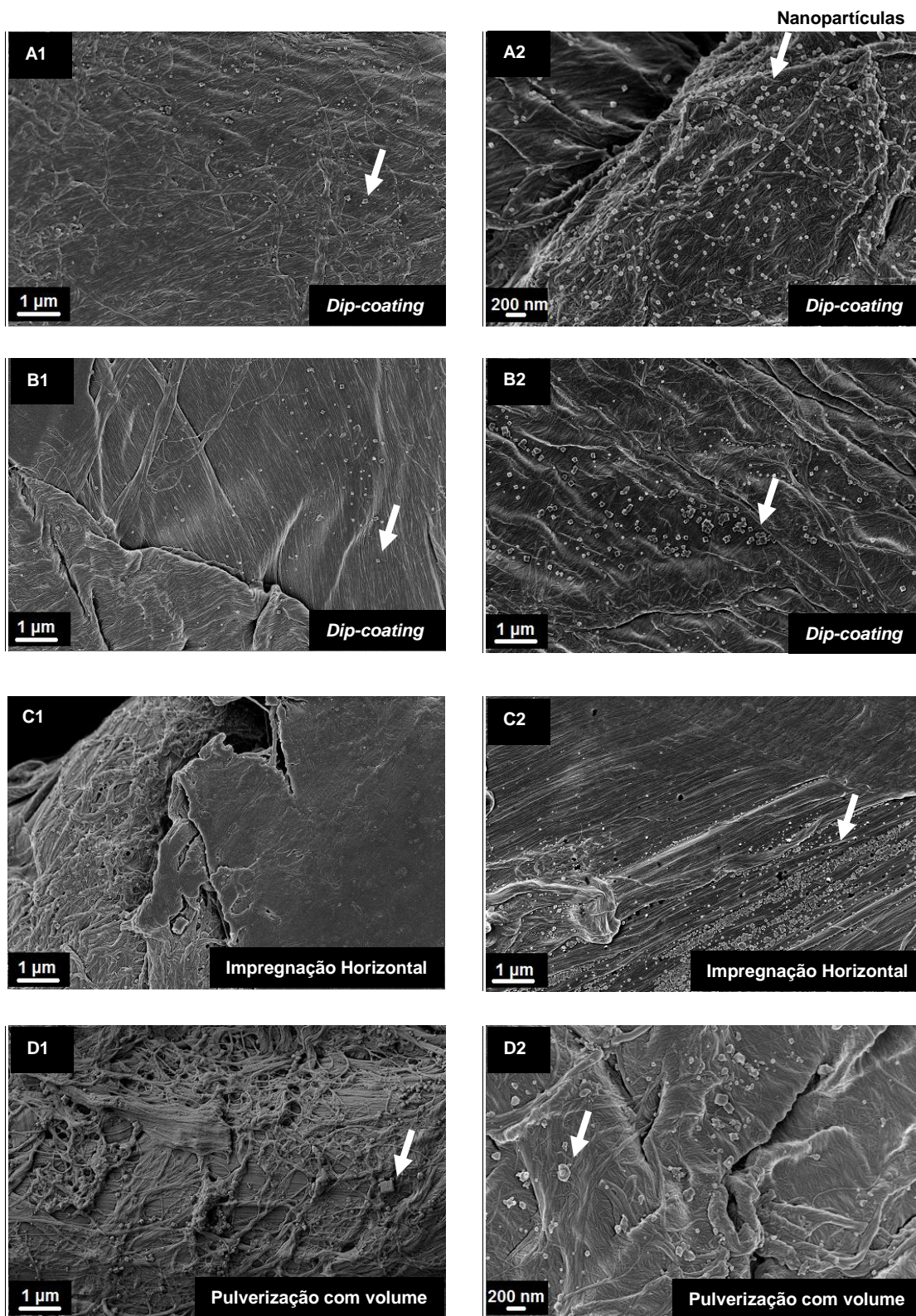


Figura 4.13 - Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com a suspensão de NPsAg via citrato de sódio. Técnicas de impregnação: A) *Dip-coating* (velocidade de saída: 10 cm/min); B) *Dip-coating* (velocidade de saída: 20 cm/min); C) Impregnação horizontal; D) Pulverização com volume. Numeração: 1) Papel *Whatman*; 2) Papel de filtro de café

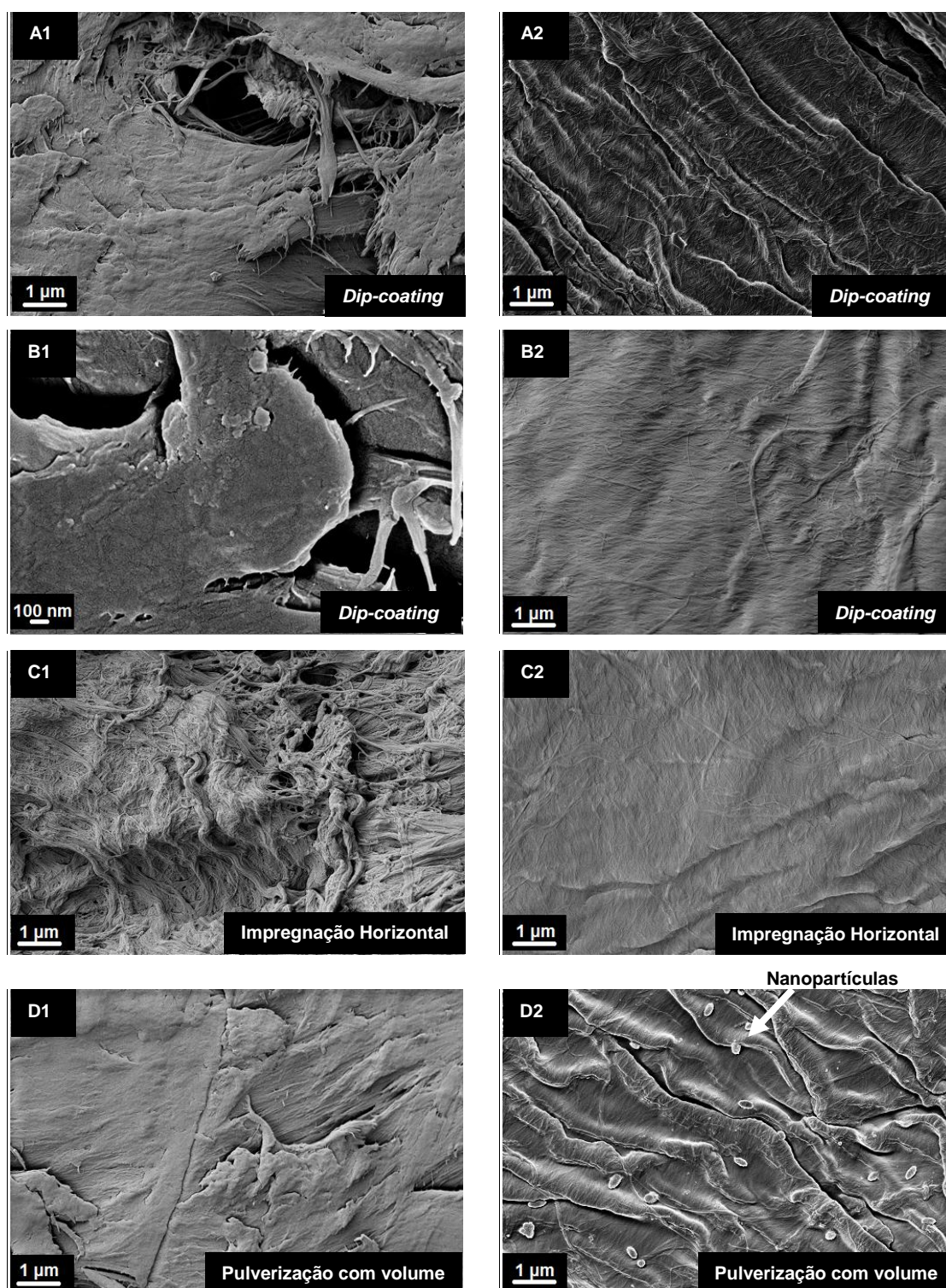


Figura 4.14 - Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com a suspensão de NPs_{Ag} via borohidreto de sódio. Técnicas de impregnação: A) *Dip-coating* (velocidade de saída: 10 cm/min); B) *Dip-coating* (velocidade de saída: 20 cm/min); C) Impregnação horizontal; D) Pulverização com volume. Numeração: 1) Papel *Whatman*; 2) Papel de filtro de café

Pela observação da Figura 4.13 verifica-se que a impregnação dos substratos de papel com a suspensão de nanopartículas de prata via citrato de sódio é bastante satisfatória, onde se obtém, com qualquer uma das técnicas de impregnação utilizadas, uma grande quantidade de nanopartículas impregnadas nos substratos de papel com uma boa dispersão ao longo das fibras de celulose. Contudo, verifica-se em todas as técnicas, que existe uma maior quantidade

de nanopartículas impregnadas no substrato de filtro de café em comparação com o papel *Whatman*, possivelmente devido ao facto do papel de filtro de café ser um papel mais poroso onde se consegue acumular uma maior quantidade de nanopartículas nos espaços vazios.

Na técnica *dip-coating* (Figura 4.13 A1 e A2 e Figura 4.13 B1 e B2), verifica-se que ao variar a velocidade de saída dos substratos de papel da suspensão de nanopartículas a quantidade de nanopartículas impregnadas em ambos os substratos de papel varia. Verifica-se que quanto maior a velocidade de saída, menor é a quantidade de nanopartículas impregnadas nas fibras de celulose, o que é expectável uma vez que o substrato de papel permanece menos tempo imerso na suspensão de nanopartículas.

Comparando a técnica de *dip-coating* (Figura 4.13 A1 e A2) com a técnica de impregnação horizontal (Figura 4.13 C1 e C2), onde os parâmetros de impregnação utilizados são os mesmos variando apenas a posição de imersão dos substratos na suspensão de nanopartículas, verifica-se que a impregnação do papel *Whatman* varia muito consoante a posição do substrato na imersão. Ao se proceder à imersão do papel *Whatman* na horizontal, a quantidade de nanopartículas acumuladas ao longo das fibras de celulose é muito menor, o que poderá estar relacionado com a própria técnica. Ao imergir verticalmente um papel numa suspensão, após a sua remoção, esta vai escorrendo ao longo do papel, possibilitando a permanência do líquido no papel, uma vez que é absorvido. Ao imergir um substrato na horizontal, após retirar da suspensão, o líquido em excesso cai directamente para a suspensão, não escorrendo ao longo do papel e ficando assim a suspensão em contacto com o papel durante um menor período de tempo. Para o papel de filtro de café verifica-se que a impregnação horizontal aglomera mais as nanopartículas enquanto o *dip-coating* dispersa-as ao longo das fibras de celulose, evitando assim a formação dos aglomerados observados na Figura 4.13 C2.

Na técnica de pulverização com volume, onde foi depositado um volume de 14 ml, observa-se uma boa impregnação dos substratos de papel com nanopartículas de prata via citrato de sódio. As nanopartículas encontram-se bem dispersas ao longo das fibras de celulose, formando um ou outro aglomerado de nanopartículas. Em comparação com as técnicas anteriormente referidas, verifica-se para este tipo de nanopartículas e para o papel de filtro de café, que o uso de um determinado volume de suspensão não aumenta significativamente a quantidade de nanopartículas depositadas no papel, porém para o papel *Whatman*, que como já foi mencionado é um papel menos poroso, o uso de volume e de pressão ajuda na impregnação deste tipo de papel aumentando a quantidade de nanopartículas impregnadas.

Na impregnação dos substratos de papel com a suspensão de nanopartículas de prata via borohidreto de sódio verifica-se, pela Figura 4.14, que nenhuma das técnicas utilizadas teve sucesso ao impregnar os substratos de papel, à excepção da técnica de pulverização com volume na impregnação do papel de filtro de café.

Como já foi mencionado neste capítulo, a morfologia das nanopartículas de prata via borohidreto de sódio é esférica e de pequeno tamanho (~ 10 – 50 nm) e as nanopartículas de prata via citrato de sódio apresentam-se em forma de bastonetes com um tamanho de ~100 nm. Por apresentarem menor tamanho era esperado que ao depositar as nanopartículas de prata via borohidreto de sódio, estas conseguissem entrar para os poros existentes nos substratos de papel, conseguindo assim uma maior impregnação do papel. Contudo não foi o sucedido, possivelmente devido à insuficiência de borohidreto de sódio na síntese das nanopartículas, não se obtendo uma redução adequada do nitrato de prata obtendo-se uma pequena quantidade de nanopartículas existentes na suspensão. Uma vez que, de acordo com a literatura [63, 64], um excesso de borohidreto de sódio provoca uma agregação das nanopartículas, necessitando para isso de uma maior quantidade de nanopartículas em suspensão.

A selecção da técnica de impregnação dos substratos de papel foi feita através dos resultados obtidos na impregnação dos substratos de papel com as nanopartículas de prata via borohidreto de sódio, onde se verificou uma maior discordância nos resultados, uma vez que os resultados obtidos na impregnação dos papéis com a suspensão de nanopartículas de prata via citrato de sódio foram, em todas as técnicas, positivos, conseguindo-se uma grande quantidade de nanopartículas impregnadas nos dois substratos de papel.

Na impregnação dos substratos de papel com a suspensão de nanopartículas de prata via borohidreto de sódio apenas se conseguiu depositar nanopartículas com a técnica de pulverização com volume. Como também se conseguiu depositar nanopartículas de prata

sintetizadas via citrato de sódio nos dois substratos de papel, selecionou-se esta técnica para a continuação do estudo com os outros dois tipos de nanopartículas (nanopartículas de óxido de zinco e nanopartículas de óxido de cobre).

4.4. Caracterização das fibras de celulose impregnadas com os diferentes tipos de nanopartículas

Na caracterização dos substratos de papel, *Whatman* e filtro de café, impregnados com as nanopartículas foi utilizado o SEM. Utilizando a mesma técnica de impregnação em todas as deposições das diferentes nanopartículas e o mesmo volume de suspensão, foi possível observar as diferenças na distribuição das nanopartículas ao longo das fibras de celulose.

Nesta etapa, foram utilizadas nanopartículas de prata sintetizadas (via citrato de sódio e via borohidreto de sódio), nanopartículas de prata comerciais, nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas e comerciais bem como nanopartículas de óxido de cobre comerciais, todas as suspensões utilizadas tinham uma concentração de 1 mM. A técnica de impregnação foi a pulverização com volume e o volume depositado de nanopartículas foi de 14 ml em substratos de papel de 7 x 7 cm.

4.4.1. Impregnação dos substratos de papel com nanopartículas de prata

As figuras em baixo exibidas (Figura 4.15) referem-se à impregnação dos substratos de papel com os diferentes tipos de nanopartículas de prata estudados.

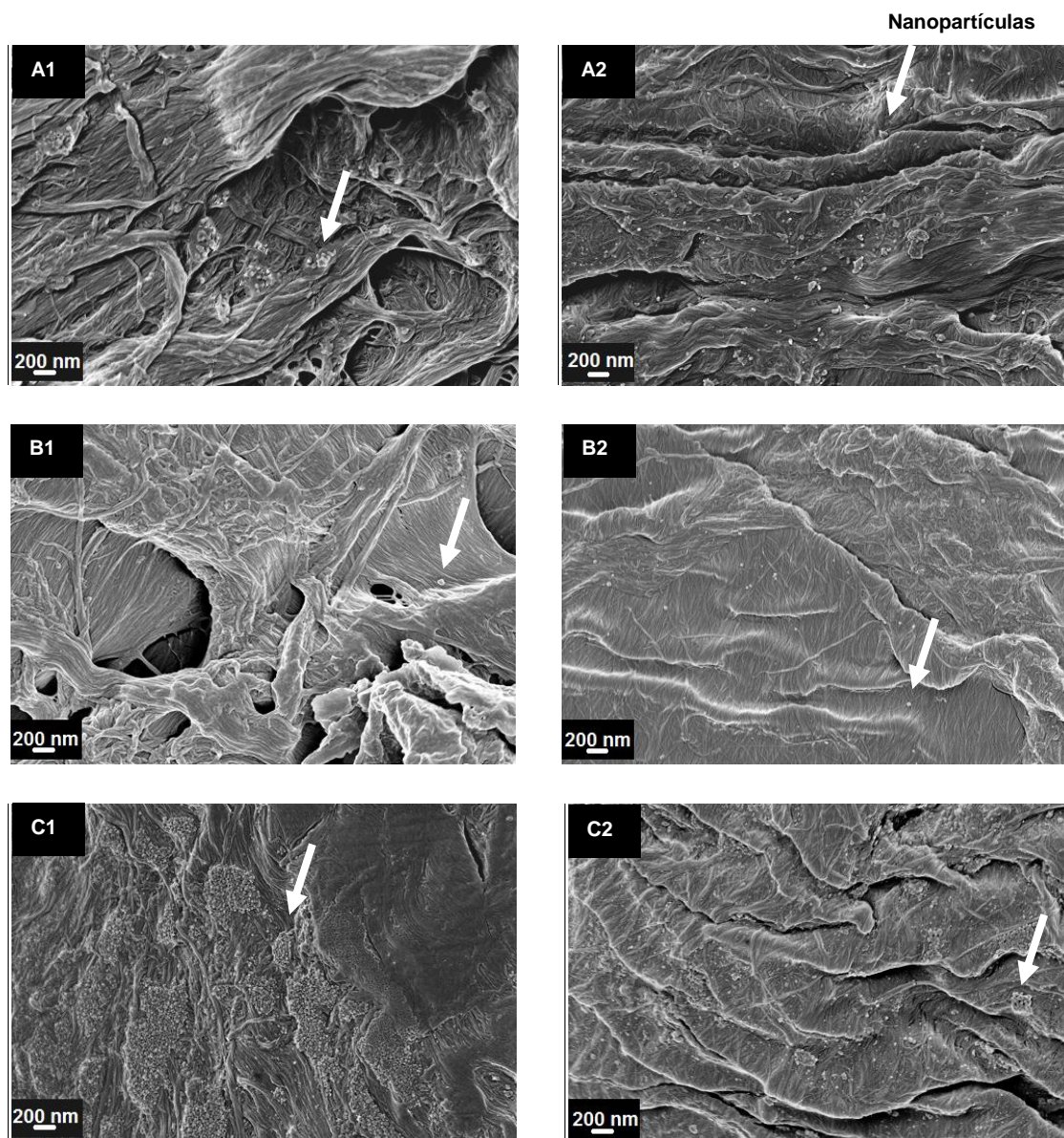


Figura 4.15 - Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com NPsAg: A) via citrato de sódio; B) via borohidreto de sódio; C) NPsAg comerciais. Numeração: 1) Papel *Whatman*; 2) Papel filtro de café

Pela observação da Figura 4.15 observa-se que impregnação do papel de filtro de café com as nanopartículas de prata via citrato de sódio (Figura 4.15 A2) e com as nanopartículas de prata comerciais (Figura 4.15 C2) são bastante idênticas, observando-se uma boa dispersão dos pequenos aglomerados de nanopartículas ao longo das fibras de celulose. Para o papel *Whatman* o mesmo não se verifica, comparando a Figura 4.15 A1 e a Figura 4.15 C1 observa-se uma maior quantidade de nanopartículas de prata comerciais impregnadas às fibras de celulose em comparação com as nanopartículas de prata via citrato de sódio impregnadas no mesmo tipo de fibras.

A partir das especificações dadas pelos fornecedores, as nanopartículas de prata comerciais apresentam um tamanho de ~ 10 nm o que leva a uma elevada área superficial. Quanto maior a área superficial, maior é a tensão superficial existente no sistema o que provoca uma agregação das partículas de modo a diminuir a elevada tensão superficial existente [63, 64]. Desta forma se percebe a grande aglomeração das nanopartículas observada na Figura 4.15 C1 e a menor aglomeração existente das nanopartículas de prata via citrato de sódio (Figura 4.15 A1), onde o tamanho das nanopartículas é cerca de dez vezes maior. A forma de aglomeração das nanopartículas de prata comerciais pode, também, estar relacionada com o tipo de geometria apresentada pelas fibras do papel *Whatman*. Como foi já mencionado no início deste capítulo, a geometria das fibras do papel *Whatman* é uma geometria cilíndrica e as fibras do papel de filtro de café apresentam uma geometria mais achatada, neste último caso

as nanopartículas depositam-se numa superfície plana e no papel *Whatman* numa superfície cilíndrica, ou seja as nanopartículas depositam-se em volta da própria fibra, aproximando-se mais umas das outras.

Embora a impregnação dos substratos de papel com as nanopartículas de prata via borohidreto de sódio não tenha sido muito eficaz, ou seja, por não se obter grande quantidade de nanopartículas impregnadas nos papéis, observa-se pelas Figuras 4.15 A1 e A2 e Figura 4.15 B1 e B2 que, no caso das nanopartículas sintetizadas, o papel de filtro de café impregna mais nanopartículas que o papel *Whatman*, uma vez que se trata de um papel mais poroso.

Apesar do tamanho das nanopartículas de prata via borohidreto de sódio ser ligeiramente superior ao tamanho apresentado pelas nanopartículas de prata comerciais a impregnação dos substratos de papel mostrou-se bastante diferente. Comparando estas impregnações (Figura 4.15 B1 e B2 e Figura 4.15 C1 e C2) verifica-se que nas primeiras imagens (Figura 4.15 B1 e B2) não se observam nanopartículas impregnadas em ambos os substratos de papel, tal diferença nas impregnações poderá estar relacionada com a estabilidade da suspensão das nanopartículas ou seja, as nanopartículas de prata comerciais podem incluir na seu fabrico algum tipo de estabilizador que não foi utilizado na síntese das nanopartículas de prata via borohidreto de sódio tornando assim a suspensão mais estável e duradoura, obtendo-se uma impregnação mais eficaz através desse tipo de nanopartículas de prata. Existe, também, a possibilidade da quantidade de nanopartículas existente na suspensão de nanopartículas de prata via borohidreto de sódio não ser suficiente para uma boa impregnação dos substratos de papel.

Em suma, observa-se que as impregnações dos substratos de papel *Whatman* e substratos de papel de filtro de café, quer usando nanopartículas de prata comerciais, quer usando nanopartículas de prata sintetizadas e recorrendo à técnica de pulverização com volume foram eficazes, alcançando-se uma boa impregnação dos substratos de papel. Na impregnação do papel de filtro de café através das nanopartículas de prata via citrato de sódio e nanopartículas de prata comerciais, obteve-se uma grande quantidade de nanopartículas depositadas nas fibras de celulose, o que não aconteceu com as nanopartículas de prata via borohidreto de sódio. No caso do papel *Whatman*, as nanopartículas de prata comerciais formaram aglomerados em forma de cachos em redor das fibras de celulose mostrando mais uma vez que a técnica de pulverização com volume se trata de uma técnica bastante promissora neste tipo de impregnação.

4.4.2. Impregnação dos substratos de papel com nanopartículas de óxido de zinco

Na impregnação dos substratos de papel com as nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas e comerciais, com uma concentração de 1 mM, seguiu-se o mesmo procedimento das nanopartículas de prata. De seguida, apresentam-se as imagens da caracterização, por SEM, dos substratos de papel impregnados com as nanopartículas de óxido de zinco (Figura 4.16).

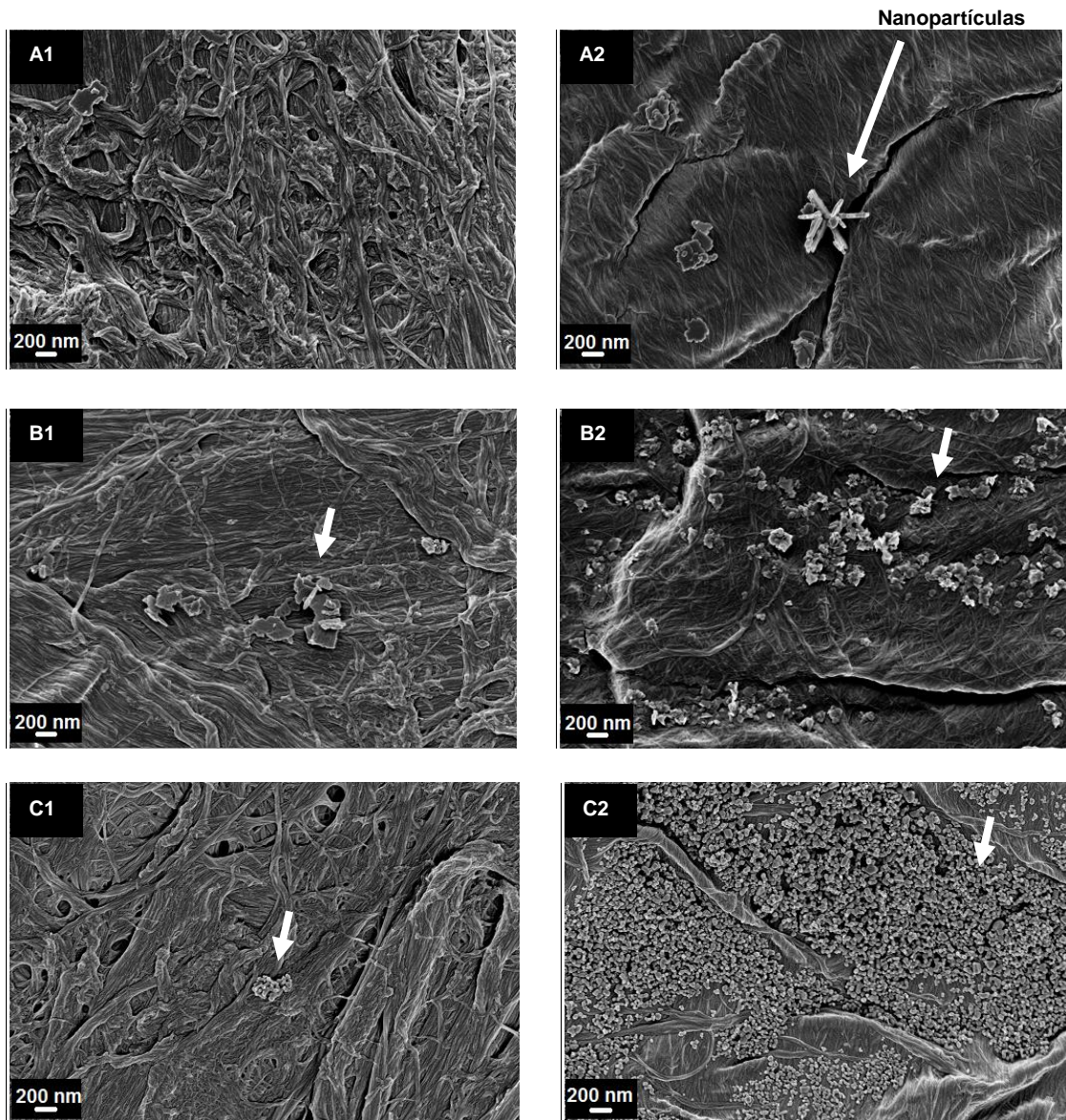


Figura 4.16 - Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com NPsZnO: A) sintetizadas; B) comerciais em pó; C) suspensão comercial. Numeração: 1) Papel *Whatman*; 2) Papel filtro de café

Observando a Figura 4.16 verifica-se, tal como se observou para as nanopartículas de prata, que o papel de filtro de café tem maior poder de absorção das suspensões de nanopartículas sendo este um papel com uma estrutura porosa.

Na impregnação do papel de filtro de café a suspensão comercial de nanopartículas de óxido de zinco (Figura 4.16 C2) apresentou resultados bastantes satisfatórios comparando com as nanopartículas de óxido de zinco comerciais em pó (Figura 4.16 B2) e sintetizadas (Figura 4.16 A2) onde se observa grande quantidade de nanopartículas impregnadas ao longo das fibras de celulose. As nanopartículas de óxido de zinco suspensão comercial apresentam um tamanho ~ 125 nm o que vai de encontro com a ficha técnica do fornecedor, que indica uma média de tamanho das partículas agregadas inferior a 180 nm.

As nanopartículas de óxido de zinco comerciais em pó (Figura 4.16 B2) quando impregnadas no papel de filtro de café apresentam-se em forma de pequenos aglomerados, onde se verifica uma maior deposição das nanopartículas entre os interstícios das fibras de celulose. O tamanho apresentado por estas nanopartículas ronda os ~ 180 nm, valor este elevado quando comparado com as especificações do fabricante, que menciona um valor de 14 nm. Esta discrepância de tamanhos das nanopartículas de óxido de zinco pode estar relacionada com a fraca estabilidade da suspensão preparada, levando à agregação das nanopartículas.

No caso das nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas a quantidade de nanopartículas depositada no substrato de filtro de café é muito reduzida, uma vez que se observa um pequeno aglomerado de partículas e algumas partículas com o formato de flocos de tamanho ~ 200 nm. Comparando com a literatura, que refere um valor entre os 10 – 15 nm, também este se apresenta bastante desviado.

Na impregnação do papel *Whatman*, quer com as nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas (Figura 4.16 A1) quer com as nanopartículas de óxido de zinco comerciais (Figura 4.16 B1 e C1), os resultados obtidos são muito idênticos, verificando-se uma baixa deposição das NPsZnO.

Resumidamente, comparando as nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas com as nanopartículas de óxido de zinco comerciais na impregnação do substrato de papel de filtro de café verifica-se que as nanopartículas de óxido de zinco suspensão comercial apresentam uma elevada deposição de nanopartículas ao longo das fibras de celulose. Contudo, todas as nanopartículas de óxido de zinco utilizadas neste estudo não mostraram uma eficiente impregnação quando depositadas nos substratos de papel *Whatman*. Verifica-se, também, que para as nanopartículas de óxido de zinco utilizadas existe uma relação entre o tamanho das nanopartículas e o grau de impregnação das fibras de celulose, onde quanto menor o tamanho das nanopartículas maior o grau de impregnação dos substratos de papel.

4.4.3. Impregnação dos substratos de papel com nanopartículas de óxido de cobre

Na impregnação dos substratos de papel com nanopartículas de óxido de cobre foi apenas utilizado um tipo de nanopartículas. Nesta impregnação procedeu-se de igual forma como para as nanopartículas de prata e nanopartículas de óxido de zinco. As imagens que se seguem (Figura 4.17) são relativas à impregnação dos dois substratos de papel com as nanopartículas de óxido de cobre comerciais.

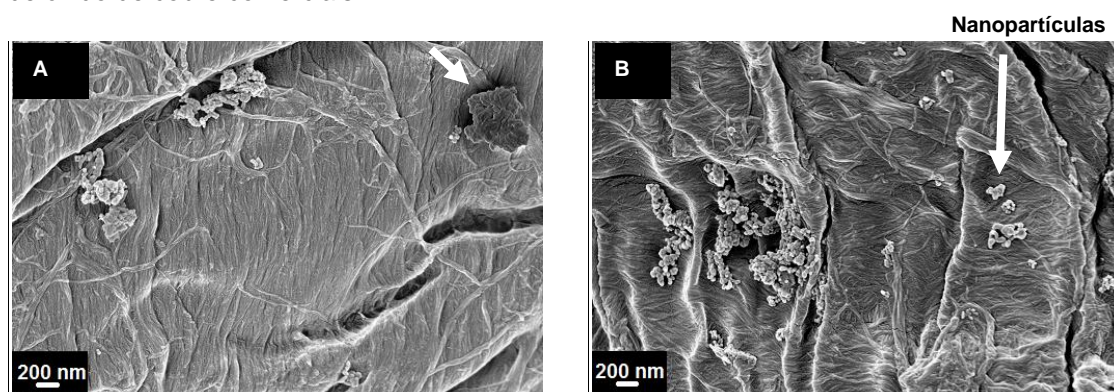


Figura 4.17 - Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com NPsCuO: A) Papel *Whatman*; B) Papel de filtro de café

A Figura 4.17 mostra o resultado da impregnação das nanopartículas de óxido de cobre nas fibras de celulose dos dois substratos de papel utilizados. Pelas imagens verifica-se que as nanopartículas de óxido de cobre apresentam um tamanho inferior a 50 nm, valor que está de acordo com as especificações do fabricante que refere um tamanho inferior a 50 nm.

Pela Figura a 4.17 B, tal como nos outros tipos de nanopartículas, observa-se um maior grau de nanopartículas de óxido de cobre impregnadas nas fibras de celulose comparando com a Figura 4.17 A. No papel de filtro de café verifica-se que as nanopartículas de óxido de cobre não apresentam uma dispersão uniforme nas fibras, formando aglomerados.

No caso do papel *Whatman*, como anteriormente mencionado, temos uma menor deposição de nanopartículas no papel e as nanopartículas que se apresentam impregnadas formam aglomerados, não se dispersando ao longo das fibras de celulose.

Em suma, para as nanopartículas de prata, nanopartículas de óxido de zinco e nanopartículas de óxido de cobre obteve-se um maior grau de impregnação das fibras de celulose no papel de filtro de café, o que pode estar relacionado com o facto do papel *Whatman* ser um papel mais espesso e mais denso, logo com menor porosidade, comparando com o papel filtro de café

(Tabela 4.1). Verificou-se também que quanto menor o tamanho das nanopartículas, maior o grau de impregnação das fibras de celulose, pois a probabilidade de preencher os interstícios entre as fibras é maior.

4.5. Estudo da actividade anti-bacteriana dos materiais produzidos

Para o estudo da actividade anti-bacteriana dos substratos de papel impregnados com as diferentes nanopartículas foram realizados testes anti-bacterianos. Os testes anti-bacterianos basearam-se em testes de difusão em agar e foram realizados usando três estirpes de bactérias: *E. coli* (Figura 4.18), *S. aureus* NCTC8325 (Figura 4.19) e *S. aureus* COL.

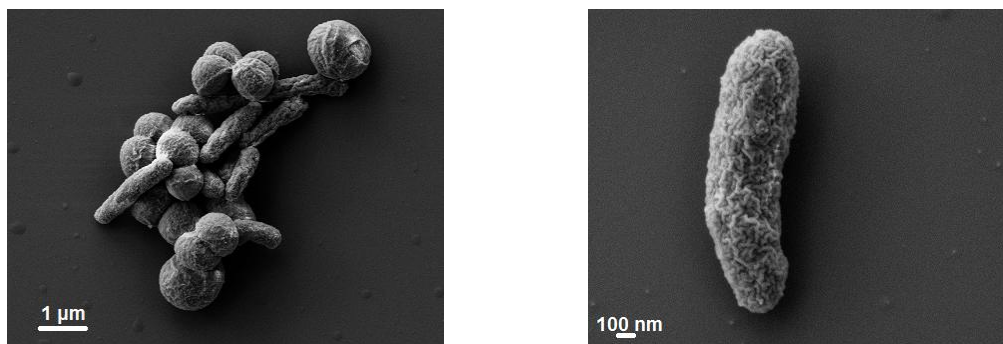


Figura 4.18 - Imagens de SEM da bactéria *Escherichia coli*

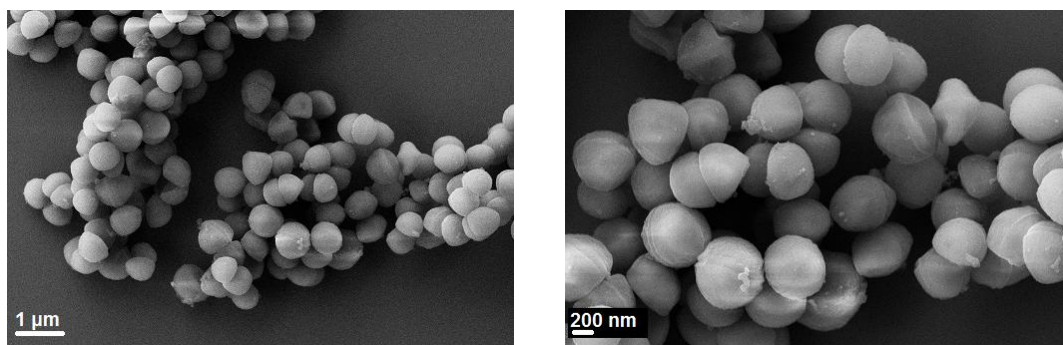
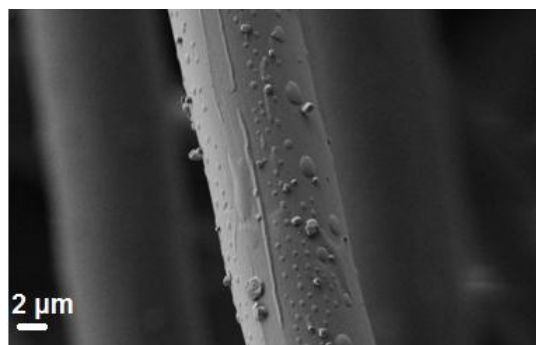
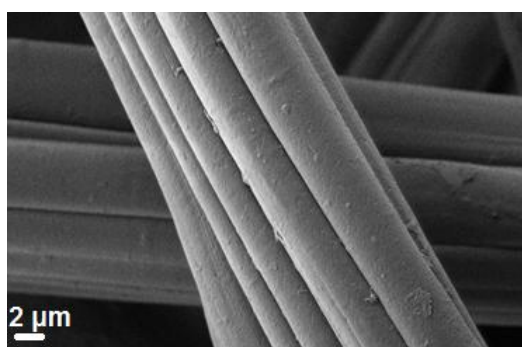


Figura 4.19 - Imagens de SEM da bactéria *Staphylococcus aureus*

Para além de se proceder à realização de testes anti-bacterianos nos materiais produzidos foram também realizados testes anti-bacterianos em materiais de controlo por forma a averiguar se a actividade anti-bacteriana era devida às nanopartículas utilizadas ou se um outro componente poderia interferir neste tipo de actividade.

4.5.1. Actividade anti-bacteriana dos materiais de controlo

Como explicado no Capítulo 3, foram utilizados materiais de controlo positivo (Penso *Hydrofiber* com prata – *Aquacel Ag*, Figura 4.20 e Penso *Hansaplast*, Figura 4.21) e materiais de controlo negativo (papel *Whatman* e papel filtro de café) nos testes anti-bacterianos. Os materiais de controlo positivo serviram como um meio de comparação entre materiais já existentes no mercado, que usam nanopartículas com efeito anti-bacteriano, e os materiais produzidos (papel impregnados com as diferentes nanopartículas). Os materiais de controlo negativo foram utilizados de modo a identificar se a verdadeira causa do efeito anti-bacteriano ocorria devido às nanopartículas e não a nenhum dos constituintes dos substratos de papel em estudo.


Figura 4.20 - Imagem de SEM do penso *Aquacel Ag*

Figura 4.21 - Imagem de SEM do penso *Hansaplast*

De seguida são apresentados na Tabela 4.5 os resultados da actividade anti-bacteriana dos materiais de controlo.

Tabela 4.5 - Actividade anti-bacteriana dos materiais de controlo: +) ocorreu actividade anti-bacteriana; -) não ocorreu actividade anti-bacteriana

| | | Estirpe | T = 25 °C | T = 37 °C |
|---------------------|-------------------------|---------------------------|-----------|-----------|
| Controlos positivos | <i>Aquacel Ag</i> | <i>E. coli</i> | + | + |
| | | <i>S. aureus</i> NCTC8325 | + | + |
| | | <i>S. aureus</i> COL | + | + |
| | Penso <i>Hansaplast</i> | <i>E. coli</i> | - | - |
| | | <i>S. aureus</i> NCTC8325 | - | - |
| | | <i>S. aureus</i> COL | - | - |
| Controlos negativos | Papel de Filtro de Café | <i>E. coli</i> | - | - |
| | | <i>S. aureus</i> NCTC8325 | - | - |
| | | <i>S. aureus</i> COL | - | - |
| | Papel <i>Whatman</i> | <i>E. coli</i> | - | - |
| | | <i>S. aureus</i> NCTC8325 | - | - |
| | | <i>S. aureus</i> COL | - | - |

Pela Tabela 4.5 verifica-se que, dos controlos positivos utilizados, apenas o *Aquacel Ag* mostrou efeito anti-bacteriano contra as três bactérias em estudo. Por outro lado, o penso *Hansaplast* não mostrou qualquer tipo de actividade anti-bacteriana, o que contradiz as indicações que são fornecidas pelos fabricantes. Segundo o fornecedor, este tipo de penso é composto por uma rede de prata que, em contacto com a ferida, liberta iões Ag (Ag^+) por forma a garantir uma cicatrização mais rápida e eficaz, evitando infecções devido a bactérias. Contudo, não se verificou este tipo de actividade quando se expôs este penso em contacto com as estirpes em estudo, pode então aferir-se que não há libertação suficiente de iões Ag^+ . Os testes anti-bacterianos efectuados com os controlos negativos mostraram que ambos os substratos de papel não apresentavam actividade anti-bacteriana. Com este resultado concluiu-se que os elementos constituintes do papel não apresentam qualquer actividade anti-bacteriana para as bactérias estudadas.

Contudo, os substratos de papel são um bom substrato para impregnação das nanopartículas por serem um material de baixo custo, acessível a todos, reciclável, biodegradável, com

elevada porosidade que, como já foi mencionado, facilita a sua impregnação, e compatibilidade química com uma vasta gama de aplicações.

De seguida, apresentam-se os resultados dos testes anti-bacterianos obtidos para os papéis impregnados com as nanopartículas de prata, nanopartículas de óxido de zinco e nanopartículas de óxido de cobre. Todas as suspensões utilizadas tinham uma concentração de 1 mM e os testes anti-bacterianos foram realizados do mesmo modo, com as mesmas bactérias e com as mesmas condições (Tabela 3.4 – Capítulo 3).

4.5.2. Actividade anti-bacteriana das nanopartículas de prata

A Tabela 4.6 apresenta os resultados obtidos dos testes anti-bacterianos efectuados com o papel impregnado com nanopartículas de prata. Com as NPsAg para além de se proceder à realização dos testes com as NPsAg sintetizadas e comerciais utilizaram-se, também, materiais de controlo. Tal como explicado no Capítulo 3, os materiais de controlo utilizados foram os dois substratos de papel (*Whatman* e filtro de café) impregnados com uma suspensão de nitrato de potássio e citrato de sódio e outra suspensão de nitrato de potássio com borohidreto de sódio. Estes materiais de controlo serviram para verificar se o efeito anti-bacteriano das nanopartículas de prata era efectivamente devido às nanopartículas de prata e não devido aos agentes redutores utilizados.

Tabela 4.6 - Actividade anti-bacteriana das NPsAg e dos materiais de controlo: +) ocorreu actividade anti-bacteriana; -) não ocorre actividade anti-bacteriana

| Materiais de controlo negativo | Estirpe | Papel <i>Whatman</i> | | Papel de Filtro de café | |
|--|--------------------------|----------------------|----------|-------------------------|----------|
| | | T = 25°C | T = 37°C | T = 25°C | T = 37°C |
| Nitrato de potássio via citrato de sódio | <i>E. coli</i> | - | - | - | - |
| | <i>S.aureus</i> NCTC8325 | - | - | - | - |
| | <i>S. aureus</i> COL | - | - | - | - |
| Nitrato de potássio via borohidreto de sódio | <i>E. coli</i> | - | - | - | - |
| | <i>S.aureus</i> NCTC8325 | - | - | - | - |
| | <i>S. aureus</i> COL | - | - | - | - |
| NPsAg | Estirpe | Papel <i>Whatman</i> | | Papel de Filtro de café | |
| | | T = 25°C | T = 37°C | T = 25°C | T = 37°C |
| Via citrato de sódio (~ 100 nm) | <i>E. coli</i> | + | + | + | + |
| | <i>S.aureus</i> NCTC8325 | + | + | + | + |
| | <i>S. aureus</i> COL | + | + | + | + |
| Via Borohidreto de sódio (~ 20 nm) | <i>E. coli</i> | - | - | - | - |
| | <i>S.aureus</i> NCTC8325 | - | - | - | - |
| | <i>S. aureus</i> COL | - | - | - | - |
| Comerciais (~10 nm) | <i>E. coli</i> | + | + | + | + |
| | <i>S.aureus</i> NCTC8325 | + | + | - | - |
| | <i>S. aureus</i> COL | + | + | - | - |

Através da análise da Tabela 4.6 é possível verificar que nos dois materiais de controlo, para qualquer estirpe de bactéria e qualquer temperatura utilizada, não ocorreu nenhum tipo de actividade anti-bacteriana. Assim, pode-se afirmar que a actividade anti-bacteriana apresentada pelos papéis impregnados com as nanopartículas de prata sintetizadas é verdadeiramente devido às nanopartículas de prata e não aos agentes redutores utilizados.

Entre os três tipos de nanopartículas de prata utilizados neste estudo, apenas as nanopartículas sintetizadas via citrato de sódio apresentam actividade anti-bacteriana sobre todos os tipos de bactérias em estudo e nas duas temperaturas utilizadas.

Nas nanopartículas de prata comerciais ocorre apenas actividade anti-bacteriana, em ambos os substratos de papel, contra a estirpe *E. coli*. Na estirpe *S. aureus* NCTC8325 e *S. aureus* COL, para qualquer uma das temperaturas, apenas se observa actividade no papel *Whatman*, o que poderá estar relacionado com o maior grau de impregnação das nanopartículas no papel *Whatman* em comparação com o papel de filtro de café (Figura 4.15 C1 e C2), onde não se observou nenhum tipo de actividade anti-bacteriana nem mesmo à temperatura não óptima do crescimento das bactérias (T = 25 °C).

As nanopartículas de prata via borohidreto de sódio não apresentaram qualquer tipo de actividade anti-bacteriana contra as estirpes de bactérias. Tal facto pode estar relacionado com a quantidade de nanopartículas existentes em ambos os substratos de papel. Pela Figura 4.15 B1 e B2 observa-se que os papéis apresentam uma baixa impregnação quando comparado com os outros dois tipos de nanopartículas de prata utilizados (Figura 4.15 A1 e A2 e Figura 4.15 C1 e C2) onde se observa uma grande quantidade de nanopartículas depositadas nas fibras de celulose.

Encontra-se reportado na literatura que existem três mecanismos de actuação das nanopartículas de prata contra as bactérias, sendo estes [15, 40, 41]:

1. As nanopartículas de prata, principalmente na gama dos 1 – 10 nm, ligam-se à superfície da membrana celular e perturbam drasticamente as suas funções, tais como a permeabilidade e respiração;
2. As nanopartículas de prata têm a capacidade de penetrar dentro das bactérias causando vários danos pela possibilidade de interacção com compostos constituídos por enxofre e fósforo;
3. As nanopartículas de prata libertam iões de prata, Ag^+ , que têm uma contribuição adicional para o efeito anti-bacteriano das nanopartículas.

Pelos três mecanismos acima referidos provavelmente poder-se-á relacionar o terceiro mecanismo com o efeito anti-bacteriano observado pelas nanopartículas de prata via citrato de sódio. A libertação de iões de prata promove um efeito anti-bacteriano através da atracção electrostática entre as cargas negativas da membrana celular dos micro-organismos e a carga positiva das nanopartículas, promovendo a ligação dos iões Ag^+ aos grupos de proteínas funcionais, resultando numa desprotonação proteica. Os iões de Ag^+ tornam-se, assim, extremamente tóxicos para as bactérias [79, 80].

No caso das nanopartículas de prata comerciais como o seu tamanho se encontra na faixa dos 1 – 10 nm é mais provável que o efeito observado esteja relacionado ao mecanismo 1, onde as nanopartículas de prata se ligam à superfície da membrana celular e perturbam as funções normais das bactérias. Como o efeito anti-bacteriano destas nanopartículas de prata foi mais eficaz na bactéria *E. coli*, sendo esta bactéria Gram negativa, ou seja possui uma fina camada de peptidoglicano (~2 – 3 nm) entre a membrana citoplasmática e a membrana exterior, é possível que estas nanopartículas de prata consigam romper essa fina camada e penetrem na bactéria perturbando assim as suas funções vitais [15, 40, 41, 80].

A partir dos resultados obtidos na actividade anti-bacteriana das nanopartículas de prata sintetizadas realizou-se um estudo da influência da concentração da suspensão de nanopartículas de prata na eficácia de impregnação e também na actividade anti-bacteriana, de modo a averiguar qual a concentração mínima necessária a partir do qual ocorre efeito anti-bacteriano.

No estudo da influência da concentração da suspensão das nanopartículas de prata sintetizadas, foram feitas suspensões com diferentes concentrações. Para as nanopartículas de prata via citrato de sódio, foram utilizadas concentrações de 0,1 mM; 0,5 mM e 10 mM. No caso das nanopartículas de prata via borohidreto de sódio, apenas foi aumentada a concentração em dez vezes, de modo a averiguar se com um aumento da concentração ocorria um aumento da impregnação dos substratos de papel e da actividade anti-bacteriana, visto que para uma concentração inferior (1 mM) nenhum destes se observou.

De seguida, apresentam-se as figuras obtidas por SEM dos substratos de papel impregnados com as nanopartículas de prata via citrato de sódio e via borohidreto de sódio com as concentrações acima referidas.

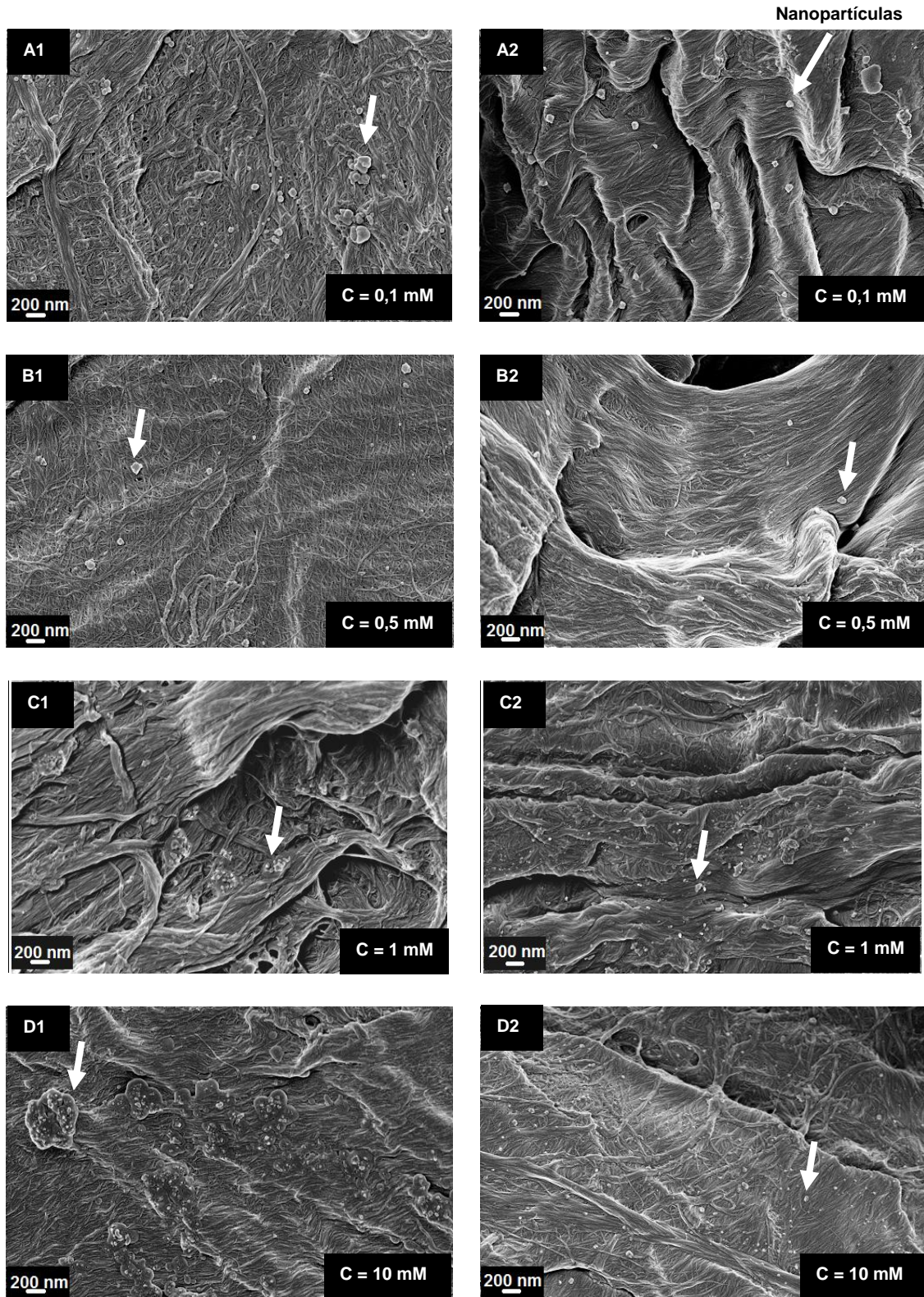


Figura 4.22 - Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel impregnados com NPsAg via citrato de sódio: A) 0,1 mM; B) 0,5 mM; C) 1 mM; D) 10 mM. Numeração: 1) Papel *Whatman*; 2) papel filtro de café

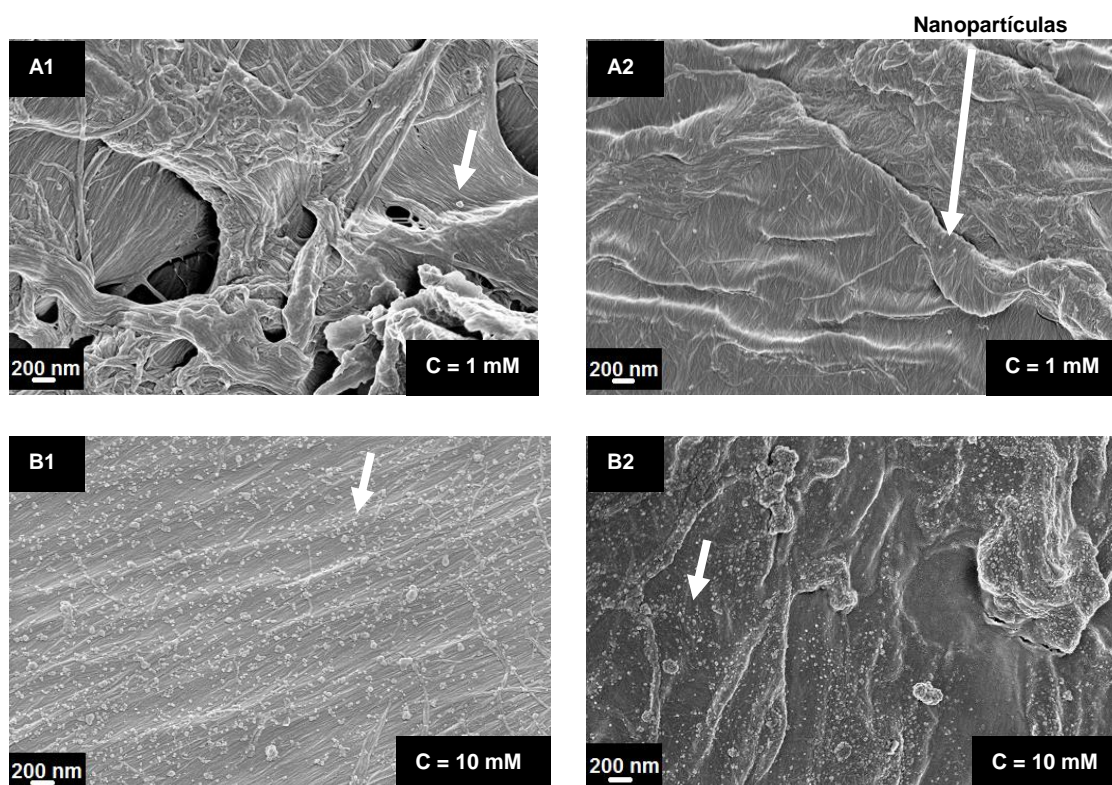


Figura 4.23 - Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com NPsAg via borohidreto de sódio: A) 1 mM; B) 10 mM. Numeração: 1) Papel *Whatman*; 2) papel filtro de café

Observando as Figuras 4.22 e 4.23 verifica-se que quanto maior a concentração de nanopartículas de prata mais eficaz se torna a impregnação de ambos os substratos de papel com as nanopartículas.

Na Figura 4.22, quer com o aumento, quer com a redução da concentração da suspensão de nanopartículas de prata, mantém-se a dispersão das nanopartículas ao longo das fibras de celulose não se observando grande quantidade de aglomerados de partículas.

Pela observação das Figuras 4.22 A1 e A2 e Figura 4.22 B1 e B2 verifica-se que ao reduzir a concentração da suspensão de nanopartículas de prata, a impregnação dos substratos de papel *Whatman* e filtro de café se torna semelhante. Ao comparar as Figuras 4.22 A1 e A2 e Figura 4.22 B1 e B2, com a Figura 4.22 C1 e C2, verifica-se que a quantidade de nanopartículas de prata impregnadas no papel diminui para as menores concentrações. Em contrapartida, assume-se, pela Figura 4.22 D1 e D2, que com o aumento da concentração da suspensão aumenta a quantidade de NPs depositadas em ambos os substratos de papel.

Pelo observado, conclui-se que tal como esperado, a concentração da suspensão é um parâmetro que influencia a quantidade de nanopartículas que se consegue depositar nos substratos de papel, sendo que ao diminuir ou aumentar a concentração a quantidade de nanopartículas depositadas também diminui ou aumenta, respectivamente.

Em relação às nanopartículas de prata via borohidreto de sódio verifica-se, comparando as Figuras 4.23 A1 e A2 e Figura 4.23 B1 e B2, uma grande diferença na impregnação dos substratos de papel. Tal como ocorreu com as nanopartículas de prata via citrato de sódio, com o aumento da concentração a impregnação do papel torna-se bastante mais eficaz. Enquanto com uma concentração de 1 mM não se observavam NPsAg no substrato de papel *Whatman*, com o aumento da concentração para 10 mM observam-se bastantes nanopartículas de prata ao longo das fibras de celulose. O mesmo sucede para o papel de filtro de café, onde com o aumento da concentração se observa um aumento da impregnação deste tipo de papel.

Em ambos os papéis as nanopartículas encontram-se bem dispersas nas fibras de celulose, formando alguns aglomerados de pequenas dimensões. Para uma concentração de 10 mM o tamanho das nanopartículas impregnadas varia entre os 10 – 70 nm.

Na Tabela 4.7 apresentam-se os resultados obtidos para a actividade anti-bacteriana com o aumento da concentração das suspensões de nanopartículas de prata sintetizadas.

Tabela 4.7 - Actividade anti-bacteriana das NPsAg sintetizadas via citrato de sódio e via borohidreto de sódio variando a concentração: +) ocorreu actividade anti-bacteriana; -) não ocorreu actividade anti-bacteriana

| NPsAg | Concentração (mM) | Estirpe | Papel <i>Whatman</i> | | Papel de filtro de café | |
|--------------------------|-------------------|---------------------------|----------------------|-----------|-------------------------|-----------|
| | | | T = 25 °C | T = 37 °C | T = 25 °C | T = 37 °C |
| Via citrato de sódio | 0,1 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + |
| | | <i>S. aureus</i> NCTC8325 | - | - | - | - |
| | | <i>S. aureus</i> COL | - | - | - | - |
| | 0,5 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + |
| | | <i>S. aureus</i> NCTC8325 | - | - | - | - |
| | | <i>S. aureus</i> COL | +/- | + | +/- | + |
| | 1 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + |
| | | <i>S. aureus</i> NCTC8325 | + | + | + | + |
| | | <i>S. aureus</i> COL | + | + | + | + |
| | 10 | <i>E. coli</i> | + | + | + | + |
| | | <i>S. aureus</i> NCTC8325 | + | + | + | + |
| | | <i>S. aureus</i> COL | + | + | + | + |
| Via borohidreto de sódio | 1 | <i>E. coli</i> | - | - | - | - |
| | | <i>S. aureus</i> NCTC8325 | - | - | - | - |
| | | <i>S. aureus</i> COL | - | - | - | - |
| | 10 | <i>E. coli</i> | +/- | - | +/- | - |
| | | <i>S. aureus</i> NCTC8325 | - | - | - | - |
| | | <i>S. aureus</i> COL | - | - | - | - |

Pela análise da Tabela 4.7 verifica-se, no caso das nanopartículas de prata via citrato de sódio, que ao diminuir a concentração da suspensão para 0,1 mM o efeito anti-bacteriano das NPs contra a bactéria *S. aureus* NCTC8325 e a bactéria *S. aureus* COL é perdido. Contudo, o efeito contra a bactéria *E. coli* mantém-se mesmo para a menor concentração testada, 0,1 mM. Para uma concentração de 0,5 mM, apesar da actividade anti-bacteriana manifestada ser fraca, verifica-se novamente um efeito anti-bacteriano das nanopartículas de prata via citrato de sódio contra a bactéria *S. aureus* COL.

Como era expectável, ao apresentar efeito anti-bacteriano para uma concentração de 1 mM, o mesmo verificou-se ao aumentar a concentração da suspensão para 10 mM, mantendo-se e tornando-se mais intensa a actividade anti-bacteriana exibida contra todas as estirpes de bactérias. A Figura 4.24 apresenta uma comparação dos halos de inibição formados na actividade anti-bacteriana das nanopartículas de prata via citrato de sódio para uma concentração de 1 mM e 10 mM.

| Estirpe | C = 1 mM | | C = 10 mM | |
|---------------------------|-----------|----------------|-----------|----------------|
| | T = 25 °C | | T = 25 °C | |
| | Whatman | Filtro de café | Whatman | Filtro de café |
| <i>E. coli</i> DH5α | | | | |
| <i>S. aureus</i> NCTC8325 | | | | |
| <i>S. aureus</i> COL | | | | |
| | T = 37 °C | | T = 37 °C | |
| | Whatman | Filtro de café | Whatman | Filtro de café |
| | | | | |
| <i>E. coli</i> DH5α | | | | |
| <i>S. aureus</i> NCTC8325 | | | | |
| <i>S. aureus</i> COL | | | | |

Figura 4.24 - Comparação dos halos de inibição formados usando uma concentração de 1 mM e 10 mM nas NPsAg via citrato de sódio

Nota: Para testar a actividade anti-bacteriana dos papéis impregnados com as nanopartículas, estes foram cortados em quadrados de 1 x 1 cm e colocados no agar de Muller-Hinton. As imagens em cima exibidas foram posteriormente tratadas por forma a melhorar a sua visualização.

Analisando a Figura 4.24 verifica-se que ocorreu um aumento do halo de inibição ao aumentar a concentração da suspensão de nanopartículas de prata via citrato de sódio, obtendo-se assim um efeito anti-bacteriano mais pronunciado.

No caso das nanopartículas de prata via borohidreto de sódio ao aumentar a concentração para 10 mM observou-se um pequeno efeito anti-bacteriano contra a bactéria *E. coli* em ambos os substratos de papel. Contudo este efeito só se observou a uma T = 25 °C, temperatura esta não óptima do crescimento das bactérias, logo maior a probabilidade de existência de efeito anti-bacteriano uma vez que as bactérias se encontram em condições adversas ao seu desenvolvimento.

Através deste estudo, verificou-se que com um aumento da concentração obtém-se um aumento da impregnação de ambos os substratos de papel e com esse aumento a actividade anti-bacteriana das nanopartículas de prata também aumenta.

Conclui-se para as nanopartículas de prata via citrato de sódio que a partir de uma concentração de 0,1 mM ocorre actividade anti-bacteriana contra a bactéria *E. coli*, sendo necessária uma concentração de 1 mM para ocorrência de actividade anti-bacteriana contra as

estirpes de *S. aureus* NCTC8325 e *S. aureus* COL. Por outro lado, para as nanopartículas de prata via borohidreto de sódio seria necessário aumentar ainda mais a concentração deste tipo de nanopartículas de prata de modo a se conseguir aumentar o fraco efeito anti-bacteriano apresentado.

4.5.3. Actividade anti-bacteriana das nanopartículas de óxido de zinco

O estudo da actividade anti-bacteriana das nanopartículas de óxido de zinco foi realizado com papéis impregnados com nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas e com nanopartículas de óxido de zinco comerciais onde ambas as suspensões apresentavam uma concentração de 1 mM.

Os testes anti-bacterianos realizados aos substratos de papel impregnados com as nanopartículas de óxido de zinco foram efetuados contra as estirpes de bactérias *E. coli*, *S. aureus* NCTC8325 e *S. aureus* COL em que a temperatura de incubação foi de 25 °C e 37 °C.

Os testes anti-bacterianos mostraram que, nem as nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas nem os dois tipos de nanopartículas de óxido de zinco comerciais apresentaram actividade anti-bacteriana contras as estirpes de bactérias em estudo. No caso do papel *Whatman* tal efeito poderá estar relacionado com a fraca impregnação dos substratos de papel com estas nanopartículas e no caso do papel de filtro de café, possivelmente devido ao elevado tamanho das nanopartículas obtidas.

Os mecanismos subjacentes à actividade anti-bacteriana das nanopartículas de óxido de zinco são alvo de grandes debates na literatura, porém existem quatro principais mecanismos de actuação das nanopartículas de óxido de zinco contra as bactérias, estes são [5, 42]:

1. Interação: nanopartículas de óxido de zinco – célula
Neste mecanismo ocorre a ligação das nanopartículas de óxido de zinco à parede celular das bactérias ou então ocorre a acumulação de nanopartículas de óxido de zinco no citoplasma, que provoca danos na membrana celular e nos componentes internos da célula como o ADN;
2. Libertação catiónica
Ocorre a libertação de catiões de zinco que inibem múltiplas actividades da bactéria, como por exemplo a glicólise, a translocação de protões transmembranares e a tolerância a ácidos;
3. Fotogeração de espécies reactivas de oxigénio (ERO)
A produção fotocatalítica de espécies reactivas de oxigénio pode danificar o ADN, a membrana celular e as proteínas das células levando à morte celular;
4. Não-fotogeração de espécies reactivas de oxigénio
A produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), $HO\bullet$ e de outras espécies reactivas de oxigénio por processos não-fotocatalíticos tais como, reacções da água com a superfície do ZnO também causam danos nas bactérias. A actividade anti-bactericida é induzida pela formação de H_2O_2 a partir do ZnO. O H_2O_2 é um potente agente oxidante e mais reactivo que as moléculas de oxigénio. É sabido que o H_2O_2 é prejudicial para as células de organismos vivos e a sua formação é o maior contribuinte para a actividade anti-bacteriana. Assim, a tendência natural das fibras de celulose em absorverem a humidade e as nanopartículas de óxido de zinco, gera H_2O_2 o que pode ser uma vantagem quando se quer formar papel com actividade anti-bacteriana.

Sendo descrito na literatura [42] que o aumento da concentração de nanopartículas de óxido de zinco leva a um aumento da actividade anti-bacteriana, foi aumentada a concentração das nanopartículas de óxido de zinco comerciais em pó para um valor de 10 mM, por forma a detectar se o efeito anti-bacteriano ocorria ou não com o aumento da concentração.

Em seguida, são apresentadas figuras obtidas por SEM, do papel impregnado com as nanopartículas de óxido de zinco comerciais em pó.

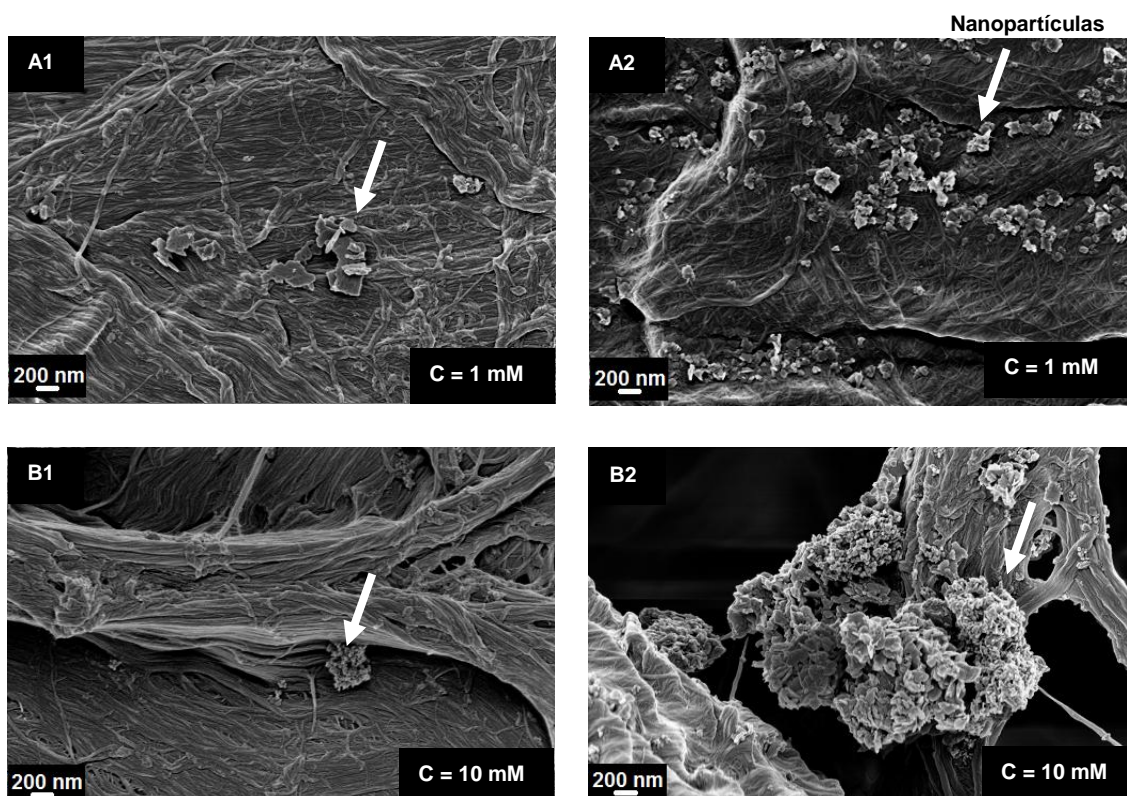


Figura 4.25 - Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com NPsZnO comerciais em pó: A) 1 mM; B) 10 mM. Numeração: 1) Papel *Whatman*; 2) Papel de filtro de café

Comparando a Figura 4.25 A1 com a Figura 4.25 B1, verifica-se que, ao contrário do que aconteceu com as nanopartículas de prata, com um aumento da concentração das nanopartículas de óxido de zinco comerciais em pó para 10 mM a impregnação das nanopartículas de óxido de zinco no substrato de papel *Whatman* não foi mais eficaz, observando-se uma baixa impregnação onde praticamente não ocorreu deposição de NPs nas fibras de celulose. Contudo, no caso do papel de filtro de café (Figura 4.25 A2 e Figura 4.25 B2), o aumento da concentração provocou um aumento da quantidade de nanopartículas de óxido de zinco depositadas no papel, possivelmente, e como foi já mencionado, devido ao facto deste tipo de papel ser um substrato mais poroso conseguindo impregnar uma maior quantidade de nanopartículas.

Realizada a impregnação dos substratos de papel com a suspensão de nanopartículas de óxido de zinco comerciais em pó, com uma concentração de 10 mM, foram realizados testes anti-bacterianos, por forma a detectar se com o aumento da concentração ocorria actividade anti-bacteriana deste tipo de nanopartículas. Os testes realizados mostraram que, mesmo com o aumento da concentração da suspensão das nanopartículas de óxido de zinco comerciais em pó, o efeito anti-bacteriano era nulo contra as três estirpes de bactérias em estudo. Tal facto pode ser explicado, no caso do papel *Whatman*, pela fraca impregnação do substrato de papel, onde a pequena quantidade de nanopartículas que se observam não seja suficiente para provocar actividade anti-bacteriana das nanopartículas de óxido de zinco contras as bactérias e com isso não ocorrerem nenhum dos mecanismos acima referidos. Por outro lado, no papel de filtro de café, a não ocorrência de actividade anti-bacteriana pode estar relacionada com o elevado tamanho das nanopartículas de óxido de zinco obtidas levando à formação de grandes quantidades de aglomerados de partículas (Figura 4.25 B2), dificultando a penetração das NPs dentro da bactéria e com isso não ocorre a interacção com muitos dos seus componentes provocando a morte celular.

Neste estudo, verifica-se que um novo aumento da concentração das nanopartículas de óxido de zinco seria favorável no caso do substrato de papel *Whatman* por forma a tentar aumentar a quantidade de nanopartículas impregnadas nas fibras de celulose. Por outro lado, para o papel de filtro de café a concentração de 10 mM poderia ser suficiente, até mesmo a concentração de 1 mM pois houve bastante impregnação das nanopartículas nas fibras de celulose. Contudo seria necessário estudar um método que conseguisse dispersar mais as nanopartículas nas fibras de celulose de modo a não se formarem grandes aglomerados como os observados na

Figura 4.25 B2 e com isso conseguir manter as nanopartículas de óxido de zinco com pequenos tamanhos de modo a facilitar a sua penetração nas bactérias activando, assim, um dos mecanismos acima mencionados levando à morte celular.

4.5.4. Actividade anti-bacteriana das nanopartículas de óxido de cobre

No estudo da actividade anti-bacteriana das nanopartículas de óxido de cobre procedeu-se nas mesmas condições como para as nanopartículas de prata e nanopartículas de óxido de zinco, onde foram feitos testes de difusão em agar contra as três estirpes de bactérias em estudo e usando as mesmas temperaturas de incubação (temperatura de 25 °C e 37 °C).

A suspensão de nanopartículas de óxido de cobre utilizada no estudo da actividade anti-bacteriana foi uma suspensão comercial com uma concentração de 1 mM.

Os resultados dos testes anti-bacterianos dos substratos de papel impregnados com a suspensão de nanopartículas de óxido de cobre mostraram-se negativos contra as estirpes *E. coli*, *S. aureus* NCTC8325 e *S. aureus* COL.

A toxicidade das nanopartículas de óxido de cobre depende de vários factores tais como a temperatura, o arejamento, o pH, a concentração de nanopartículas de óxido de cobre e a concentração de bactérias utilizadas. O aumento da temperatura e do arejamento e a diminuição do pH, diminuem a aglomeração das nanopartículas aumentando assim a toxicidade das mesmas. Na verdade, uma menor aglomeração das nanopartículas promove o aumento da área superficial disponível para a interacção com a membrana celular das bactérias e para a solubilização dos iões de cobre (Cu), conduzindo assim a uma maior toxicidade. Temos também que as formas iónicas e metálicas do Cu produzem radicais hidróxila que provocam danos em proteínas essenciais e no ADN das bactérias [15].

Alguns dos mecanismos anti-bacterianos das nanopartículas de óxido de cobre já identificados baseiam-se na [43, 44, 45]:

1. Formação de espécies reactivas de oxigénio (ERO) como o H_2O_2 que são gerados à superfície das nanopartículas de óxido de cobre e que têm a capacidade de se difundir no meio celular através da membrana celular conduzindo assim à morte das bactérias;
2. As nanopartículas de óxido de cobre possuem elevada capacidade de penetração na membrana celular, e uma vez no interior da célula pode ocorrer a libertação de iões Cu^{2+} iniciando-se a produção de ERO intracelular ou danificando directamente proteínas intracelulares levando à morte celular;
3. Ao penetrar na membrana celular desencadeia-se uma rede de ligações intracelulares que conduzem ao desenvolvimento de *stress* oxidativo e à apoptose.

Os resultados negativos dos testes anti-bacterianos efectuados às nanopartículas de óxido de cobre podem estar relacionados, no caso do papel *Whatman*, com a reduzida quantidade de nanopartículas impregnadas no papel, não sendo suficiente para ocorrência de actividade anti-bacteriana e no caso do substrato de papel de filtro de café devido à pouca dispersão das NPs nas fibras de celulose que leva à aglomeração das nanopartículas, factor que, como explicado em cima, dificulta a actividade anti-bacteriana deste tipo de nanopartículas.

Como foi visto para as nanopartículas de prata, com o aumento da concentração da suspensão de nanopartículas a actividade anti-bacteriana era mais pronunciada. Assim sendo, aumentou-se a concentração da suspensão de nanopartículas de óxido de cobre para os 10 mM, por forma a averiguar se o efeito anti-bacteriano não exibido por este tipo de nanopartículas ocorria.

As figuras que se seguem foram obtidas por SEM e referem-se às nanopartículas de óxido de cobre de concentração 1 mM e 10 mM.

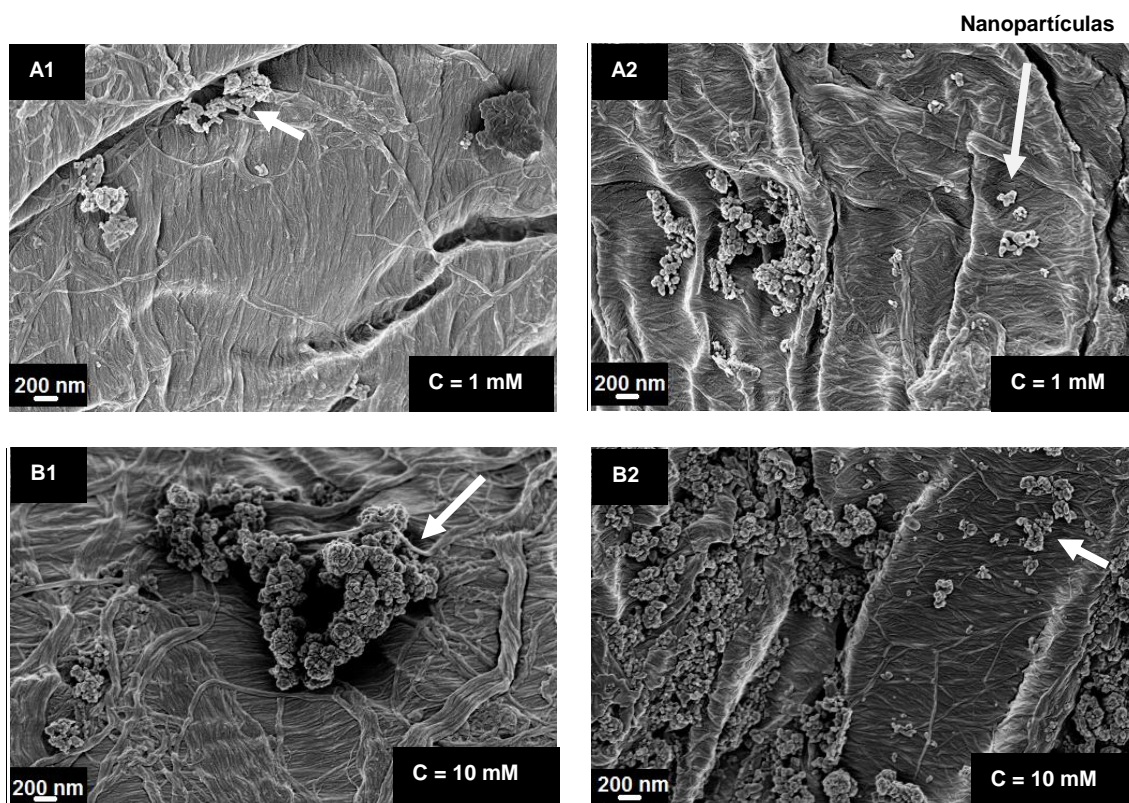


Figura 4.26 - Imagens de SEM da impregnação dos substratos de papel com NPsCuO comerciais: A) 1 mM; B) 10 mM. Numeração: 1) Papel *Whatman*; 2) Papel de filtro de café

Observando as Figuras 4.26 B1 e 4.26 B2 verifica-se que em ambos os casos, com um aumento da concentração para 10 mM a impregnação das fibras de celulose é superior. Apesar da impregnação do papel *Whatman* ter aumentado, em comparação com a impregnação com uma menor concentração (Figura 4.26 A1), observa-se que a impregnação do papel de filtro de café continua a ser superior, por este ser um papel mais poroso onde se observam uma maior quantidade de nanopartículas depositadas em comparação com o papel *Whatman* e em comparação com a concentração inferior, 1 mM (Figura 4.26 A2).

Em ambas as impregnações dos substratos de papel com as suspensões de 10 mM, (Figura 4.26 B1 e B2), observa-se, sobretudo no papel *Whatman*, que as nanopartículas de óxido de cobre formam muitos aglomerados de partículas.

Ao realizar os testes anti-bacterianos, verificou-se que com a impregnação da suspensão de 10 mM, estes continuaram a dar negativos, ou seja, não foi evidenciado nenhum tipo de actividade anti-bacteriana contra as diferentes estirpes em estudo. O ocorrido pode ser devido à pouca dispersão das nanopartículas de óxido de cobre e à formação dos aglomerados, que pelo que foi dito em cima, quanto maior a aglomeração das nanopartículas menor a actividade anti-bacteriana.

A formação de aglomerados de nanopartículas provoca uma diminuição da área superficial das nanopartículas dificultando, desta forma, a interação com as bactérias diminuindo a probabilidade de ocorrer algum tipo de mecanismo relacionado com a actividade anti-bacteriana das nanopartículas de óxido de cobre.

Com estas observações, destaca-se que para ocorrência de actividade anti-bacteriana com este tipo de nanopartículas de CuO seja necessário ajustar alguns dos parâmetros que acima foram referidos (temperatura, pH, arejamento, concentração das nanopartículas e das bactérias) de modo a aumentar a probabilidade de ocorrência do efeito desejado.

Capítulo 5: Conclusões e Perspectivas Futuras

O papel ao ser um material comum no dia-a-dia e tendo como principais propriedades o baixo custo, biodegradabilidade, flexibilidade e porosidade, torna-se um substrato muito atractivo para diversas aplicações. Neste estudo o papel foi utilizado como substrato para aplicações anti-bacterianas. Com recurso à nanotecnologia e a técnicas de impregnação, foram depositadas nanopartículas de prata, nanopartículas de óxido de zinco e nanopartículas de óxido de cobre no papel.

No presente estudo foram utilizados dois substratos de papel diferentes. Os papéis utilizados foram: papel de cromatografia *Whatman* e um papel de filtro de café.

Na caracterização dos substratos de papel conclui-se que o papel de filtro de café é mais poroso, logo menos denso, apresenta menor espessura e a morfologia das suas fibras é achatada. Por sua vez, o papel *Whatman* é um papel menos poroso, com maior espessura e com uma morfologia de fibras cilíndricas.

Um dos objectivos iniciais deste trabalho consistiu na síntese de nanopartículas de prata e nanopartículas de óxido de zinco, com uma concentração de 1 mM. No caso das nanopartículas de prata foram realizadas duas sínteses químicas usando dois agentes redutores diferentes (citrato de sódio e borohidreto de sódio), de modo a verificar diferenças entre ambas as sínteses. Na síntese via citrato de sódio obteve-se nanopartículas com um tamanho ~ 80 nm em forma de bastonetes e na síntese via borohidreto de sódio foram obtidas nanopartículas de menor tamanho (~ 20 nm) que apresentavam uma morfologia esférica.

No caso das nanopartículas de óxido de zinco realizou-se uma síntese por aquecimento via micro-ondas onde se obteve nanopartículas com um tamanho de ~ 200 nm, onde as nanopartículas se apresentavam bastante aglomeradas com uma estrutura laminar.

Neste trabalho, para além das nanopartículas sintetizadas, foram usadas nanopartículas comerciais de prata, óxido de zinco e óxido de cobre. Estas nanopartículas comerciais foram utilizadas para garantir um termo de comparação entre estas nanopartículas e as nanopartículas sintetizadas, podendo-se aferir sobre a estabilidade, modo de impregnação, tamanho, morfologia e actividade anti-bacteriana das nanopartículas.

Outro objectivo passou pela determinação do melhor método de impregnação das fibras de celulose dos dois tipos de substratos de papel. Para isso, foram seleccionadas três técnicas: *dip-coating*, impregnação horizontal e pulverização com volume. A técnica de impregnação que mostrou melhores resultados, revelando-se uma técnica muito eficiente, foi a técnica de pulverização com volume. Através desta técnica conseguiu-se, em ambos os substratos de papel, uma boa impregnação, sendo que uma boa impregnação dos substratos de papel passa pela introdução de uma grande quantidade de nanopartículas nas fibras de celulose e uma boa dispersão das mesmas. Contudo, a disposição das nanopartículas no papel mostrou eficiências diferentes: para as nanopartículas de prata sintetizadas via citrato de sódio e nanopartículas de prata comerciais conseguiu-se uma boa impregnação dos dois papéis; por outro lado, com as nanopartículas de prata via borohidreto de sódio o papel de filtro de café obteve apenas uma pequena quantidade de nanopartículas impregnadas e no papel *Whatman* as nanopartículas não permaneceram nas fibras de celulose.

Na impregnação do papel de filtro de café com as nanopartículas de óxido de zinco obteve-se resultados diferentes entre as nanopartículas sintetizadas e as comerciais. No caso das sintetizadas a impregnação foi muito ineficaz, uma vez que para além da reduzida quantidade de nanopartículas, estas apresentavam-se em forma de aglomerados. Já no caso das nanopartículas de óxido de zinco comerciais em pó e suspensão comercial, a impregnação foi bastante eficiente, onde grande quantidade de nanopartículas se fixou às fibras de celulose e se dispersou bem ao longo destas.

No caso da impregnação do papel *Whatman* com todas as nanopartículas de óxido de zinco não se verificou o mesmo. A impregnação deste papel foi baixa, pois não se obteve praticamente nanopartículas nas fibras de celulose.

Tal como na impregnação das nanopartículas de óxido de zinco, a impregnação dos substratos de papel com nanopartículas de óxido de cobre mostrou-se mais eficiente usando o papel de filtro de café, onde se obteve maior quantidade de nanopartículas impregnadas nas fibras de celulose.

Sendo que não houve variação dos parâmetros no modo de impregnação dos substratos, conclui-se que a eficiência da impregnação está relacionada com o tipo de substrato de papel utilizado. Em comparação com o papel *Whatman*, como o papel de filtro de café é mais poroso, ou seja, possui maior número de espaços vazios, este consegue impregnar maior quantidade de nanopartículas. Assim sendo, entre os dois substratos de papel, o papel de filtro de café mostrou-se mais eficaz na impregnação com os diferentes tipos de nanopartículas.

De modo a testar a actividade anti-bacteriana das nanopartículas impregnadas nos substratos de papel foram testadas três estirpes bacterianas (*E. coli* DH5 α , *S. aureus* NCTC8325 e *S. aureus* COL) e duas temperaturas de incubação diferentes, 25 °C e 37 °C, que correspondem à temperatura não óptima e temperatura óptima de crescimento e desenvolvimento das bactérias, respectivamente. Ao utilizar estas duas temperaturas foi possível estudar a actividade anti-bacteriana das bactérias no seu clima normal (37 °C) e num clima adverso ao seu crescimento (25 °C), contudo uma temperatura favorável a muitas das suas possíveis aplicações.

De todos os substratos de papel impregnados com nanopartículas o que se mostrou mais eficiente (usando uma C = 1 mM) em ambas as temperaturas de incubação e em todas as bactérias, foi o papel impregnado com as nanopartículas de prata sintetizadas via citrato de sódio, que exibiu actividade anti-bacteriana, ou seja, ocorreu a morte celular das bactérias. No caso nanopartículas de prata comerciais também os dois substratos de papel se mostraram eficientes apenas para a bactéria *E. coli* em ambas as temperaturas de incubação.

Para as restantes nanopartículas nenhum dos papéis mostrou qualquer tipo de actividade anti-bacteriana, tal facto pode ser devido a vários factores, tais como: tamanho, forma e grau dispersão das nanopartículas nas fibras de celulose, concentração de nanopartículas, concentração das bactérias, temperatura, pH, etc.

Após os resultados obtidos para as suspensões de 1 mM foi realizado um estudo de influência da concentração na eficácia da impregnação dos substratos de papel e também na actividade anti-bacteriana. Este estudo permitiu perceber se a concentração influenciava ou não a quantidade de nanopartículas impregnadas em ambos os substratos de papel e averiguar como o aumento da concentração variava a actividade anti-bacteriana.

Para este estudo diminuiu-se a concentração das nanopartículas de prata via citrato de sódio para 0,1 mM e 0,5 mM, de modo a identificar qual a concentração mínima necessária para ocorrência de actividade anti-bacteriana. Foi, também, aumentada a concentração para os 10 mM por forma a aferir sobre o aumento, ou não, da actividade anti-bacteriana com o aumento da concentração. Como as nanopartículas de prata sintetizadas via borohidreto de sódio, nanopartículas de óxido de zinco comerciais em pó e para as nanopartículas de óxido de cobre não apresentaram qualquer tipo de actividade anti-bacteriana para uma concentração de 1 mM, para estas nanopartículas foi aumentada a concentração para os 10 mM, de forma a identificar se a partir desta concentração já se obtinha qualquer tipo de efeito anti-bacteriano.

Através deste estudo de concentração verificou-se que a impregnação de ambos os substratos de papel com as nanopartículas de prata, quer via citrato de sódio quer via borohidreto de sódio, aumentou. Contudo, para as nanopartículas de prata via borohidreto de sódio só se observou um fraco efeito anti-bacteriano contra a bactéria *E. coli*, em ambos os substratos de papel e para uma T = 25 °C, sendo esta a temperatura não óptima de crescimento das bactérias. Para as nanopartículas de prata via citrato de sódio concluiu-se que a partir de uma concentração de 0,1 mM ocorreu morte celular contra a bactéria *E. coli*, sendo que para as estirpes *S. aureus* NCTC8325 e *S. aureus* COL ocorreu actividade anti-bacteriana a partir de uma concentração de 1 mM. Porém, em todas as estirpes de bactérias verificou-se, para as nanopartículas de prata via citrato de sódio, um aumento do halo de inibição com o aumento da concentração para os 10 mM.

Para as nanopartículas de óxido de zinco comerciais em pó e nanopartículas de óxido de cobre, com o aumento da concentração ocorreu um ligeiro aumento da impregnação do substrato de papel *Whatman*, onde as nanopartículas impregnadas se agregavam. Todavia este aumento de nanopartículas impregnadas no papel *Whatman* não se mostrou suficiente para a ocorrência de actividade anti-bacteriana. Para o papel de filtro de café a impregnação do papel mostrou-se mais eficiente com o aumento da concentração, porém formaram-se muitos aglomerados de partículas, dificultando assim a ocorrência de actividade anti-bacteriana, onde quanto melhor a dispersão e menor o tamanho das nanopartículas, melhor o efeito anti-bacteriano.

Este trabalho, devido às já mencionadas e variadas propriedades do papel, conduz a muitas aplicações em diversas áreas. Muitas das aplicações poderão passar pela área médica, por exemplo no fabrico de papel de parede para a unidade de queimados dos hospitais, onde é necessário um espaço esterilizado de modo a evitar o crescimento de bactérias e outros micro-organismos. Uma outra aplicação médica poderia ser na unidade de pediatria, no uso de toalhas e fraldas específicas com este tipo de material impregnado de forma a promover uma limpeza e tratamento mais adequados de dermatites.

Na área desportiva, no uso de têxteis impregnados com NPs por forma a evitar o crescimento bacteriano. Na área alimentar, por exemplo, em embalagens de comida promovendo uma segurança alimentar mais eficaz dos alimentos armazenados e em filtros de água, promovendo uma limpeza anti-bacteriana. Uma outra aplicação poderia ser no fabrico de panos de limpeza domésticos de modo a evitar o desenvolvimento de bactérias em zonas comuns a várias pessoas, como a cozinha e a casa de banho.

No seguimento deste estudo, seria importante um maior foco das nanopartículas de óxido de zinco e nanopartículas de óxido de cobre de modo a estudar formas de dispersar estas nanopartículas ao longo das fibras de celulose evitando a formação de aglomerados de nanopartículas que levam a um aumento das suas dimensões, não se mostrando tão eficazes no combate às bactérias.

Seria, também, interessante uma abordagem em substratos de papel transparente de modo a visualizar melhor a formação do halo de inibição formado quando ocorre efeito anti-bacteriano, pois em alguns dos casos em estudo é possível que tenha ocorrido inibição por contacto e esta não ter sido perceptível devido ao tipo de substrato ser opaco.

Referências bibliográficas

- [1] Alves, J. F.; *Indústria da pasta e do papel em Portugal*; Grupo Portucel, ed. Portucel SGPS, SA.
- [2] Roberts, J.C. *The chemistry of paper*, Royal Society of Chemistry, (1996).
- [3] Duarte, A.P., Simões, R., Belgacem, N., Silvy, J., Silva, M.J.S. *O papel*. Universidade da Beira Interior – Universidade de Materiais Têxteis e Papeleiros (2000).
- [4] Costa, R.N.C.C., *Industrialização do método Layer-by-layer no fabrico do papel*. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (2008).
- [5] Martins, N.C.T., Freire, C. S. R., Neto, C. P., Silvestre, A. J. D., Causio, J., Baldi, G., Sadocco, P., Trindade, T.; *Antibacterial paper based on composite coatings of nanofibrillated cellulose and ZnO*; Colloids and Surfaces A: Physicochem, Eng. Aspects 417 111 – 119 (2013).
- [6] Correia, N.F.O.. *Produção e caracterização de dispositivos electrocrómicos em substratos à base de celulose*. Tese de Mestrado em Engenharia de Materiais. Departamento de Ciência dos Materiais. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa. Lisboa (2008).
- [7] Oliveira, S. T.; *Efeito do tratamento hiperbárico na hidrólise de pasta kraft com xilanase*; Tese de Mestrado em Engenharia Química. Universidade de Aveiro. Aveiro (2010).
- [8] <http://nutrition.jbpub.com/resources/images/images/fibergif>. (Pesquisado a 18Janeiro2013).
- [9] <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>. (Pesquisado a 18 de Janeiro de 2013).
- [10] Ngo, Y. H., Li, D., Simon, G.P., Garnier, G.; *Paper surfaces functionalized by nanoparticles*; Advanced in Colloid and Interface Science 163 23 – 38 (2011).
- [11] Costa, M.Q.N.; *Desenvolvimento de microfluídica em papel para utilização em biossensores*. Tese de Mestrado em Engenharia Biomédica. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa. Lisboa (2012).
- [12] Rocha, C.S. *Plasticidade do papel e design*. Lisboa: Plátano Editora (2000).
- [13] <http://www.paperonweb.com/grade.html>. Pesquisado a 08 de Agosto de 2013.
- [14] Kim, J., Kwon, S., Ostler, E. *Antimicrobial effect of silver-impregnated cellulose: potencial for antimicrobial therapy*. Journal of Biological Engineering, 3:20 (2009).
- [15] Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., Aberasturi, D. J., Larramendi, I.R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W., Mahmoudi, M.; *Antibacterial properties of nanoparticles*; Trends in Biotechnology, vol.30, No.10. Cell Press (Outubro 2012).
- [16] Ferreira, N. S. *Morfologia e propriedades estruturais de nanopartículas de ZnO sintetizadas pelo processo sol-gel proteico*. Tese de Mestrado em Física. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, SE – Brasil (2010).
- [17]<http://ec.europa.eu/health/opinions2/en/nanotechnologies/1-3/3-nanoparticle-properties.html>. (Pesquisado a 08 de Agosto de 2013).
- [18] Humberto, L.; Garza-Trevino, E.; Ixtapan-Turrent, L.; Singh, D.; *Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds*; Journal of Nanobiotechnology, 9:30 (2011)
- [19] Júnior, M.A.M; Santos, L.S.S.; Gonçalves, M.C.; Nogueira, A.F. (2012). *Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino*
- [20] Oliveira, G.M.; Carvalho, A.J.F.; Pessan, L.A. *Obtenção de nanopartículas de prata/dióxido de titânio pelo método Turkevich para aplicações antimicrobianas em matrizes poliméricas*.
- [21] Pyatenko, A. *Synthesis of Silver nanoparticles with laser assistance*. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST). Nanotechnology research institute. Tsukuba – Japan; (2010).
- [22] Koga, H.; Kitaoka, T. *On-paper synthesis of silver nanoparticles for antibacterial applications*. Kyushu University – Japan.
- [23] Prabhu, S., Poulouse, E.K., *Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects*. International Nano Letters, 2:32, 2228-5326 (2012).
- [24] Srivastava, V., Gusain, D., Sharma, Y.C.; *Synthesis, characterization and application of zinc oxide nanoparticles (n-ZnO)*. Ceramics International; Elsevier (2013).
- [25] Ghule, K., Ghule, A.V., Chen, B., Ling, Y.; *Preparation and characterization of ZnO nanoparticles coated paper and its antibacterial activity study*; Green Chem; The Royal Society of Chemistry 8, 1034 – 1041 (2006).

- [26] Sharma, D., Sharma, S., Kaith, B.S., Rajput, J., Kaur, M.; *Synthesis of ZnO nanoparticles using surfactant free in-air and microwave method*; Applied Surface Science 257; 9661 – 9672 (2011).
- [27] Lanje, A.S., Sharma, S.J., Pode, R.B., Ningthoujam, R. S.; *Synthesis and optical characterization of copper oxide nanoparticles*; Advances in Applied Science Research, 1 (2): 36 – 40 (2010).
- [28] Ren, G., Hu, D, Cheng, E., Vargas-Reus, M.A., Reip, P., Allaker, R.P.; *Characterization of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications*. International Journal of Antimicrobial Agents 33 587-590 (2009).
- [29] Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Bebianno, M.J.; *Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of mytilus galloprovincialis*; Aquatic Toxicology 118 – 119, 72 – 79 (2012).
- [30] Patel, M.; *Developments in Antibacterial paper*. Industry Insight. Pira International (2009)
- [31] Chopra, I.; *Antibiotics*; In: eLS. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; <http://www.els.net> Doi: 10.1038/npg.els.0002225; (2002).
- [32] Lorian, V.; *Antibiotics in laboratory medicine*; 4th Ed.; U.S.A.: Williams & Williams; Baltimore, Maryland (1996).
- [33] *Provas de Susceptibilidade aos anti-microbianos. Diferentes metodologias*. Aula prática nº5; Microbiologia médica (2006 – 2007).
- [34] Gallavotti, B.; *Segredos da vida*; Enciclopédia de Ciência vol.9. Hiperlivro, ASA Editores (1997)
- [35] Tille, P.; *Diagnostic Microbiology*; 13ª Ed; Bailey & Scott's. Elsevier; (2013)
- [36] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P.; *Brock Biology of Microorganisms*; 12th Ed.; Pearson Benjamin Cummings; San Francisco, CA (2009)
- [37]http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acpmedicine/4663/infeccoes_causadas_por_escherichia_coli_e_outros_bacilos_entericos_gram_negativos_%E2%80%9393_michael_s_donne.htm. (Pesquisado a 23 de Agosto de 2013).
- [38]http://pt.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli (Pesquisado a 23 de Agosto de 2013).
- [39]<http://www.tuasaude.com/bacteria-kpc-klebsiella-pneumoniae-carbapenemases/>. (Pesquisado a 23 de Agosto de 2013).
- [40] Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J., Ramírez, J.T., Yacaman, M.J.; *The bactericidal effect of silver nanoparticles*; Nanotechnology 16; 2346 – 2353 (2005).
- [41] Guzman, M., Dille, J., Godet, S.; *Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria*; Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 8; 37 – 45 (2012).
- [42] Wang, C., Liu, L., Zhang, A., Xie, P., Lu, J., Zou, X.; *Antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles on Escherichia coli K88*; African Journal of Biotechnology vol. 11(44), pp. 10248 – 10254, 31 (May 2012).
- [43] Fahmy, B., Cormier, S.A.; *Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells*; Toxicol In Vitro; 23(7): 1365 – 1371, (October 2009).
- [44] Piret, J., Jacques, D., Audinot, J., Mejia, J., Boilan, E., Noel, F., Fransolet, M., Demazy, C., Lucas, S., Saout, C., Toussaint, O.; *Copper (II) oxide nanoparticles penetrate into HepG2 cells, exert cytotoxicity via oxidative stress and induce pro-inflammatory response*; Nanoscale, 4, 7168 (2012).
- [45] Ahamed, M., Siddiqui, M.A., Akhtar, M.J., Ahmad, I., Pant, A.B., Alhadlaq, H.A.; *Genotoxic potencial of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells*; Biochemical and Biophysical Research Communications 369; Elsevier 578 – 583 (2010).
- [46] Jia, B., Mei, Y., Cheng, L., Zhou, J, Zhang, L. *Preparation of copper nanoparticles coated films with antibacterial properties through one-step reduction*. ACS Applied Materials Interfaces, 4, 2897-2902 (2012).
- [47] Newbury, D.E., Jay, D.C., Lymon, C.E., Echlin, P., LifShin, E., Michael, J.R., Goldstein, J.I, Sawyer, L. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Third Edit, New York:Luwer Academic/Plenum Publishers, (2003).
- [48] Brundle, C.R., Evans, C.A., Wilson, S. *Encyclopedia of Materials Characterization*. Greenwich: Manning Publications Co. (1992).
- [49] Castro, L.; *Processamento de amostras para Microscopia Electrónica de Varredura*. Centro de pesquisa agropecuária de clima temperado - Embrapa. (Novembro de 2002).

- [50] <http://www.cenimat.fct.unl.pt/services/laboratory-nanofabrication>. (Pesquisado a 13 de Agosto de 2013).
- [51] <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/3548/13/cap33a-TEM.pdf>. (Pesquisado a 13 de Agosto de 2013).
- [52] Pereira, J. C.; *Estudo do comportamento de nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes suspensões*; Tese de Mestrado em Engenharia de Materiais; Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa. Lisboa (2010).
- [53] http://rnme.up.pt/index_3_pt.htm. (Pesquisado a 13 de Agosto de 2013).
- [54] http://www.lactad.unicamp.br/?page_id=38. (Pesquisado a 13 de Agosto de 2013).
- [55] <http://www.stri.si.edu/espanol/investigaciones/microscopia/confocal/index.php>. (Pesquisado a 13 de Agosto de 2013).
- [56] http://www.intercovamex.com/ic_perfilometria.html. (Pesquisado a 14 de Agosto de 2013).
- [57] <http://www.cenimat.fct.unl.pt/services/laboratory-electronic-and-optoelectronic-materials-and-devices/profilometer-ambios-xp-plus-200-stylus>. (Pesquisado a 14 de Agosto de 2013).
- [58] <http://pt.scribd.com/doc/53575282/Espectroscopia-na-Regiao-do-UV-VIS>. (Pesquisado a 13 de Agosto de 2013).
- [59] <http://www.cenimat.fct.unl.pt/services/laboratory-electronic-and-optoelectronic-materials-and-devices/uv-vis-nir-spectrophotometer-shimadzu-uv-3101pc>. (Pesquisado a 13 de Agosto de 2013).
- [60] *Dynamic Light Scattering: An introduction in 30 minutes*. Technical note. Malvern Instruments.
- [61] Cardoso, M. J. R. S.; *Nanopartículas de lecitina revestidas de polissacarídeos para o aumento da biodisponibilidade oral de antineoplásticos*. Monografia de Licenciatura. Faculdade de Ciências Sociais da Saúde/ Escola Superior de Saúde - Universidade Fernando Pessoa. Porto (2009).
- [62] Santos, J.R.L.; *Produção e desenvolvimento de dispositivos baseados em materiais termoelétricos*. Tese de Mestrado em Engenharia de Materiais. Departamento de Ciência dos Materiais. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa. Lisboa (2011).
- [63] Garcia, M. V. D.; *Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis*; Tese de Mestrado em Engenharia Química; Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – São Paulo. Brasil (2011).
- [64] Solomon, S.D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A.V., Rutkowsky, S.A., Boritz, C.; *Synthesis and study of silver nanoparticles*; Journal of Chemical Education, vol.84, No.2; (February 2007).
- [65] <http://www.cenimat.fct.unl.pt/services/laboratory-electronic-and-optoelectronic-materials-and-devices/sonicator-up400s>. (Pesquisado a 07 de Agosto de 2013).
- [66] Dias, D. J. A.; *Estudo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias patogénicas de gram negativo*. Tese de Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina. Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa. Lisboa (2009).
- [67] http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lcf/aguilar_g_ae/apendiceB.pdf. (Pesquisado a 15 de Julho de 2013).
- [68] *Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos*; Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- [69] <http://loja.tonimed.com.br/curativo-aquacel-ag-com-prata-convatec-10x10cm.html>. (Pesquisado a 07 de Agosto de 2013).
- [70] <http://int.hansaplast.com/Products/wound-care/universal-antibacterial>. (Pesquisado a 07 de Agosto de 2013).
- [71] Sampaio, J.A.; *Caracterização de fibras de celulose recobertas por plasma*. Tese de Mestrado em Engenharia de Materiais. Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro (2013).
- [72] Tserki, V., Zafeiropoulos, N.E., Simon, F., Panayiotou, C.; *A study of the effect of acetylation and propionylation surface treatments on natural fibres*, Composites: Part A 36; Elsevier; 1110 – 1118 (2005).
- [73] Borysiak, S., Doczekalska, B. *X-ray Diffraction study of pine wood treated with NaOH*, FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe, , vol.13, No.5 (53); (January/December 2005).
- [74] Silva, M.C., Lopes, O.R., Colodette, J.L., Porto, A.O., Rieumont, J., Chaussy, D., Belgacem, M.N., Silva, G.G.; *Characterization of three non-product materials from a bleached eucalyptus kraft pulp mill, in*

view of valorizing them as a source of cellulose fibres; Industrial Crops and Products 27; Elsevier; 288-295 (2008).

[75] Majeed Khan, M.A., Kumar, S, Ahamed, M., Alrokayan, S.A., Alsalhi, M.S., Alhoshan, M., Aldwayyan, A.S.; *Structural and spectroscopic studies of thin film of silver nanoparticles*; Applied Surface Science 257 10607 – 10612 (2011).

[76] Temgire, M.K., Joshi, S.S.; *Optical and structural studies of silver nanoparticles*; Radiation Physics and Chemistry 71 1039 – 1044 (2004).

[77] Vivekanandhan, S., Christensen, L., Misra, M., Mohanty, A.K.; *Green process for impregnation of silver nanoparticles into microcrystalline cellulose and their antimicrobial bionanocomposite films*; Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 3, 371 – 376 (2012).

[78] Sikora, B, Fronc, K., Kaminska, I., Baranowska-Korczyc, A., Sobczak, K., Dluzewski, P., Elbaum, D.; *The growth kinetics of colloidal ZnO nanoparticles in alcohols*; J Sol-Gel Sci Technol 61:197 – 205 (2012).

[79] J.S. Kim et al; *Antimicrobial effects of silver nanoparticles*; Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 3 95 – 101; (2007)

[80] Sondi, I.; Sondi-Salopek, B.; *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E.coli as a model for Gram-negative bacteria*; Journal of Colloid and Interface Science 275; 177 – 182 (2004)